

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دانشگاه علوم پزشکی قزوین

دانشکده پیراپزشکی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان

بررسی اثر **miR-184** روی تمایز الیگودندروسیتی سلول های **Neural**
progenitor stem cells(NPSC) به منظور سلول درمانی بیماری **MS**

اساتید راهنما

دکتر فرزاد رجایی و دکتر فاطمه کوه کن کهنگی

اساتید مشاور

دکتر نعمت الله غیبی و دکتر محمد صالحی

نگارنده

نگین افرنگ

تیر ماه 1395

سپاسگزاری:

سپاس و ستایش از آن خداوندی است که بنده کوچکش را در دریای بیکران اندیشه، قطره ای ساخت تا وسعت آن را از دریچه اندیشه های ناب آموزگاران بزرگ به تماشا نشیند. لذا اکنون که سایه سار بنده نوازی هایش پایان نامه حاضر به انجام رسیده است، بر خود لازم می دانم تا مراتب سپاس از بزرگوارانی را به جا آورم که اگر دست یاریگرشان نبوده، هرگز این پایان نامه به انجام نمی رسید.

ابتدا از اساتید گرامتقدم سرکار خانم دکتر فاطمه کوه کن کهنگی و جناب آقای دکتر فرزاد رجایی که زحمت راهنمایی این پایان نامه را به عهده داشتند کمال سپاس را دارم. از اساتید عالی قدرم جناب آقای دکتر نعمتالله غیبی و جناب آقای دکتر محمد صالحی که زحمت مشاوره این پایان نامه را متحمل شدند، صمیمانه تشکر می کنم.

سپاس آخر را به مهربانترین همراهان زندگیم، به پدر و مادر عزیزم تقدیم می کنم که حضورشان در فضای زندگیم مصداق بی ریای سخاوت بوده است.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
1	چکیده.....
فصل اول: مقدمه	
4	1-1 micro RNA ها:.....
5	2-1 تولید زیستی میکرو RNA ها :
7	3-1 شناسایی مولکول های هدف میکرو RNA :
7	4-1 توزیع بافتی میکرو RNA ها:.....
8	5-1 نقش میکرو RNA ها در بیماری های مختلف:
8	1-5-1 نقش میکرو RNA ها در سرطان:.....
8	2-5-1 نقش میکرو RNA ها در بیماری های خود ایمنی:
12	3-5-1 نقش میکرو RNA ها در تمایز سلول های بنیادی
14	6-1 مسیر تمایزی از سلول های Neural progenitor stem cells به سمت سلول های الیگودندروسیت
16	7-1 بیماری MS:.....
21	8-1 نقش miR-184 در تمایز سلول های بنیادی عصبی:
فصل دوم: مروری بر مطالعات گذشته	
فصل سوم: مواد و روش ها	
32	1-3 مواد مورد استفاده
32	1-1-3 آنزیم ها
32	1-1-1-3 برای انجام PCR، RT-PCR و Real-time PCR
32	2-1-1-3 برای کلون کردن ژن های Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1, anti-miR-184 و تأیید ورود آن در وکتور
32	1-2-3 محیط های کشت
32	1-1-2-3 محیط کشت و ذخیره سازی باکتری
32	2-1-2-3 محیط کشت سلولی
32	1-3-3 آنتی بیوتیک ها
32	4-1-3 کیت ها
33	5-1-3 سلول ها
33	1-1-5-3 سلول های پروکاریوتی

- 33.....2-1-5-3 سلول های یوکاریوتی
- 33.....1-6-3 سایر مواد
- 33.....1-7-3 وسایل یک بار مصرف
- 33.....1-8-3 دستگاه ها
- 33.....1-9-3 وکتورهای مورد استفاده
- 33.....2-3 دستورالعمل های عمومی
- 33.....1-2-3 طرز تهیه ی محلول ها و بافر ها
- 33.....1-1-2-3 بافر الکتروفورز تریس- اسید استیک (TAE 50X)
- 34.....2-1-2-3 محلول کلسیم کلرید $CaCl_2$
- 34.....2-2-3 طرز تهیه ی آنتی بیوتیک ها
- 34.....1-2-2-3 آنتی بیوتیک آمپی سیلین
- 34.....2-2-3 آنتی بیوتیک کانامایسین
- 34.....3-3 روش کار
- 34.....1-3-3 کشت باکتری
- 34.....1-1-3-3 کشت مایع *E. coli*
- 35.....2-1-3-3 کشت جامد *E. coli*
- 35.....3-3-2 واکنش زنجیره ای پلی مرز
- 36.....4-3-3 کلون کردن ژن Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 در وکتور psi-checkII
- 37.....5-3-3 مستعد نمودن باکتری با روش شیمیایی (کلسیم کلرید) و ترانسفورماسیون
- 37.....6-3-3 انجام واکنش کلونی PCR برای تأیید ورود وکتور حاوی قطعات Bcl2L1,
- 38.....LINGO-1, Sox-1 به باکتری
- 39.....7-3-3 تخلیص پلاسمید از باکتری ترانسفرم شده
- 40.....8-3-3 آشکار سازی محصولات استخراج شده (پلاسمید) با الکتروفورز روی ژل آگارز
- 40.....9-3-3 انجام هضم آنزیمی دوباره جهت تأیید کلونینگ
- 41.....10-3-3 کشت سلول های HEK 293T
- 41.....11-3-3 ترانسفکت سلول های HEK 293T با وکتور حاوی miR-184 به روش کلسیم فسفات جهت ساخت ویروس
- 42.....12-3-3 جمع آوری ویروس و فیلتر کردن آن
- 44.....13-3-3 کشت سلول های Neural progenitor stem cells
- 44.....14-3-3 ترانسداکت سلول های NPSC با استفاده از ویروس های ساخته شده
- 44.....15-3-3 استخراج RNA (Total RNA)

- 3-3-15-1- کنترل کیفیت RNA استخراج شده 45
- 3-3-16- ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده 46
- 3-3-17- انجام واکنش Real time PCR برای بررسی بیان ژن ها 46
- 3-4- ترانسفکشن سلول های HEK-T293 با لیپوفکتامین: 48
- 3-5- تست لوسیفرز برای بررسی تأثیر miR-184 روی ژن های موردنظر: 48
- 3-6- ایمونوسیتوشیمی برای بررسی بیان آنتی ژن های الیگودندروسیتی 49
- 3-7- وسترن بلاتینگ روی نمونه های پروتئینی استخراج شده از سلول های هفته دوم و سوم: 50
- 3-8- آماده سازی پلاسمید برای تزریق: 53
- 3-9- انجام آزمایش in vivo 54

فصل چهارم: نتایج و یافته ها

- 4-1- نتایج مربوط به تهیه سازه مورد نیاز برای انجام پروژه 56
- 4-1-1- نتیجه استخراج پلاسمید pLentiIII-miR-184 56
- 4-2- نتایج ترانسفکشن سلول های HEK 293T با استفاده از پلاسمیدهای psPAX2, pLentiIII-miR-184, pMD2G با روش کلسیم فسفات 56
- 4-3- نتایج تعیین تیترو ویروس 58
- 4-4- نتایج ترانسداکشن سلول های Neural progenitor stem cell جهت بیان ژن miR-184 و تمایز به سمت سلول های الیگودندروسیت 59
- 4-5- نتیجه آنالیز Real-time PCR روی نمونه های ترانسداکشن شده 61
- 4-6- نتیجه آنالیز ICC روی نمونه های ترانسداکشن شده 65
- 4-7- نتایج وسترن بلاتینگ سلول های Neural progenitor stem cell 66
- 4-8- نتایج مربوط به تهیه سازه مورد نیاز برای انجام پروژه 68
- 4-8-1- نتیجه استخراج پلاسمید psi-checkII 68
- 4-8-2- نتیجه واکنش PCR برای تکثیر ژن های Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 68
- 4-8-3- نتیجه هضم وکتور با آنزیم های محدود کننده XhoI و NotI 70
- 4-8-4- نتیجه کلونی PCR بعد از ترانسفورماسیون وکتور کلون شده psi-checkII/Bcl2L1, psi-checkII/LINGO-1, psi-checkII/Sox-1 71
- 4-8-5- نتیجه هضم آنزیمی روی پلاسمیدهای استخراج شده برای تأیید وجود ژن مورد نظر 73
- 4-9- نتایج ترانسفکشن سلول های HEK 293T با استفاده از پلاسمید psi-checkII/Bcl2L1, psi-checkII/LINGO-1, psi-checkII/Sox-1 با روش لیپوفکتامین 74
- 4-10- نتایج لوسیفرز ژن های Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 روی سلول HEK-T293 75

11-4- نتایج آزمایشات روی موجود زنده: 76

فصل پنجم: بحث، نتایج و پیشنهادات

1-5- دستاوردهای طرح 81

2-5- پیشنهادات برای پژوهش های آینده 83

منابع: 84

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول 1-1: تعدادی از miRNAها که در بیماری MS نقش دارند.	11
جدول 1-2: ژن های هدف miR-184 و سایت های اتصال به این ژن ها را نشان می دهد. در این نرم افزار هر قدر میزان P _{CT} مثبت تر باشد، احتمال اتصال به ژن را بهتر و بیشتر می کند.	22
جدول 3-1: مواد مصرفی و مقادیر آنها در واکنش PCR	35
جدول 3-2: برنامه سیکل های زمانی واکنش PCR	35
جدول 3-3: توالی پرایمرهای به کارگرفته شده جهت کلونینگ لوسیفراز	36
جدول 3-4: مواد استفاده شده و مقادیر آن ها در واکنش اتصال	37
جدول 3-5: برنامه سیکل های زمانی برای کلونی PCR	39
جدول 3-6: توالی پرایمرهای به کارگرفته شده جهت کلونینگ	39
جدول 3-7: مواد و مقادیر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی دوگانه برای پلاسمید موردنظر	40
جدول 3-8: مواد و مقادیر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی دوگانه برای ژن LINGO-1	40
جدول 3-9: مواد و مقادیر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی دوگانه برای ژن Bcl2L1	41
جدول 3-10: مواد و مقادیر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی دوگانه برای ژن Sox-1	41
جدول 3-11: مواد مورد نیاز برای واکنش ساخت cDNA	46
جدول 3-12: شرایط دمایی واکنش ساخت cDNA	46
جدول 3-13: اجزای لازم برای واکنش Real-Time PCR در دستگاه Light Cycler 1.5X	47
جدول 3-14: برنامه زمانی مراحل واکنش Real-Time PCR ژن ها	47
جدول 3-15: برنامه زمانی Melting	47
جدول 3-16: مقادیر مورد نیاز برای ترانسفکشن با لیپوفکتامین	48
جدول 3-17: مقادیر لازم برای انجام ترانسفکشن در تست لوسیفراز	49
شکل 1-4: چاهک اول نردبان ژنی 1kb خریداری شده از شرکت BioRon، چاهک دوم پلاسمید pLentill-miR-	184
جدول 1-4: میزان پارتيكل های ویروس محاسبه شده هر پلیت سلول که با توجه به نتایج فلوسایتومتری محاسبه شده است.	59

فهرست شکل‌ها

- عنوان
صفحه
- شکل 1-1: بیوژنز miRNA: رونویسی از ژن‌های کدکننده miRNA در هسته و به فرم-pri-miRNA انجام می‌شود. کمپلکس Drosha-DGCR8 اولین مرحله پردازش را بر روی-pri-miRNA انجام داده و آن را به فرم pre-miRNA در می‌آورد که در مرحله بعد توسط Exportin-5/Ran GTP از هسته به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. در سیتوپلاسم pre-miRNA توسط آنزیم Dicer به دوپلکس miRNA پردازش می‌شود. از دوپلکس miRNA یک رشته روی کمپلکس RISC بارگذاری می‌شود می‌تواند با اتصال به mRNA هدف موجب تخریب و یا مهار ترجمه آن شود (Winter, Jung et al. 2009)..... 6
- شکل 2-1: پروفایلینگ miRNA ها در مراحل تمایزی (رنگ سبز میزان پایین بیان و رنگ قرمز میزان بالای بیان را نشان می‌دهد). 13
- شکل 3-1: مراحل تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی برای ترمیم میلین آسیب دیده. 16
- شکل 4-1- سمت چپ: سلول‌های سالم عصبی. سمت راست: سلول‌های آسیب دیده توسط T-cell در بیماری MS..... 17
- شکل 5-1- تقسیم بندی پراکندگی جغرافیایی ام اس در جهان..... 17
- شکل 6-1- دوره‌های بالینی MS 19
- شکل 7-1- نقش miRNA در فرآیند میلین سازی نموی 20
- شکل 8-1: پروفایلینگ miRNA ها در مرحله تبدیل پیش ساز گلیالی به پیش ساز الیگودندروسیتی 22
- شکل 1-4- چاهک اول نردبان ژنی 1kb خریداری شده از شرکت BioRon، چاهک دوم پلاسمید pLentill-miR-184 56
- شکل 3-4- نشان دهنده سلول‌های نشان داده شده در شکل قبل می‌باشد. در این شکل به جای نور مرئی از نور فرابنفش برای مشاهده سلول‌ها استفاده شده است و همچنین از فیلتر رنگ مناسب استفاده گردیده است تا سلول‌ها در صورت داشتن پروتئین GFP به رنگ سبز دیده شوند. همانگونه که مشاهده می‌شود سلول‌ها در اثر ترانسفکت با وکتور pLentill در این شکل به رنگ سبز دیده می‌شوند که نشان دهنده موفقیت آمیز بودن آزمایش ترانسفکت می‌باشد. 57
- شکل 4-4- نشان دهنده سلول‌های HEK 293T از همان نمای اشکال فوق الذکر می‌باشد. در این شکل سلول‌ها هم با نور مرئی و هم با نور فرابنفش دیده می‌شوند. از این شکل می‌توان به درصد

سلول های ترانسفکت شده پی برد و همانگونه که از شکل پیداست تقریباً تمامی سلول ها در این گروه ترانسفکت شده و رنگ سبز پیدا کرده اند..... 58

شکل 4-5 نتایج مربوط به بررسی میزان بیان GFP سلول های تیمار و کنترل جهت بررسی میزان پارتیکل ویروسی تولید شده. تصویر 1 نشان دهنده سلول های کنترل است و تصاویر دیگر نشان دهنده غلظت های متفاوت بیان GFP سلول های تیمار می باشند. 59

شکل 4-7- نیز همان سلول ها را زیر نور مرئی نشان می دهد. 60

شکل 4-8 نیز همان سلول ها زیر هر دو نور مرئی و فرابنفش را نشان می دهد. با استفاده از این شکل می توان به درصد سلول های ترانسداکت شده پی برد. با توجه به طراحی آزمایش صورت گرفته عکس ها پس از 48 ساعت از تیمار سلول های NPSC که به تعداد 30 هزار سلول در کف پلیت 48 خانه کاشته شده و همزمان با ویروس تیمار شده بودند گرفته شده اند..... 60

شکل 4-9- نتایج مربوط به آنالیز بررسی ژن های هدف miR-184 در هفته اول. **Error! Bookmark not defined.**

شکل 4-10- نتایج مربوط به آنالیز بررسی ژن های هدف miR-184 در هفته دوم. **Error! Bookmark not defined.**

شکل 4-11- نتایج مربوط به آنالیز بررسی ژن های هدف miR-184 در هفته سوم. **Error! Bookmark not defined.**

شکل 4-12- نتایج بررسی ژن های هدف miR-184 در هفته اول بدون فاکتور رشد..... 63

شکل 4-13- نتایج بررسی ژن های هدف miR-184 در هفته دوم بدون فاکتور رشد..... 63

شکل 4-14- نتایج بررسی ژن های هدف miR-184 در هفته سوم بدون فاکتور رشد..... 64

شکل 4-15 و 4-16 به ترتیب نشان دهنده سلول های گروه ترانسداکت شده و سلول های کنترل در روز 5 برای بیان آنتی بادی Olig2 که با فلورسنت و DAPI رنگ آمیزی شده اند..... 79
شکل 4-17 و 4-18 به ترتیب نشان دهنده سلول های گروه کنترل و سلول های ترانسداکت شده برای بیان آنتی بادی NKX2.2 در روز 5 هستند..... 79
شکل 4-19 و 4-20 به ترتیب نشان دهنده سلول های گروه ترانسداکت شده و سلول های کنترل برای بیان آنتی بادی MBP در روز 21 هستند..... 79

شکل 4-21- نشان دهنده بررسی آنتی بادی Olig2، Nkx2.2 و MBP روی نمونه کنترل و سلول ترانسداکت شده است. الف) چاهک اول و دوم کنترل داخلی β -actin روی نمونه های کنترل و چاهک سوم کنترل داخلی β -actin روی نمونه های ترانسداکت شده می باشد. ب) چاهک اول و دوم نمونه کنترل و چاهک سوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 با آنتی بادی MBP می باشد. ج) چاهک اول و دوم نمونه کنترل و چاهک سوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 با آنتی بادی

- Olig2 می باشد. د) چاهک اول و دوم نمونه کنترل و چاهک سوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 با آنتی بادی Nkx2.2 می باشد. 67
- شکل 4-22- نشان دهنده بررسی آنتی بادی های Lingo-1, Sox-1, Bcl2L1 روی نمونه کنترل و سلول ترانسداکت شده است. الف) چاهک اول و دوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 و چاهک سوم نمونه کنترل برای آنتی بادی β -actin می باشد. ب) چاهک اول و دوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 و چاهک سوم نمونه کنترل برای آنتی بادی Lingo-1 می باشد. ج) چاهک اول و دوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 و چاهک سوم نمونه کنترل برای آنتی بادی Sox-1 می باشد. د) چاهک اول و دوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 و چاهک سوم نمونه کنترل برای آنتی بادی Bcl2L1 می باشد. 68
- شکل 4-23- انجام PCR ژن LINGO-1: چاهک اول نردبان ژنی 100bp خریداری شده از شرکت BioRon، چاهک دوم، سوم و چهارم نمونه PCR شده از ژن LINGO-1 با باند 900bp و چاهک پنجم کنترل منفی. 69
- شکل 4-24- انجام PCR روی Bcl2L1 چاهک اول و سوم نمونه PCR شده روی ژن Bcl2L1، چاهک دوم نردبان ژنی 100bp خریداری شده از شرکت BioRon و چاهک چهارم کنترل منفی. 69
- شکل 4-25: انجام PCR روی Sox-1 چاهک اول و دوم و سوم نمونه های PCR شده روی ژن Sox-1 چاهک چهارم نردبان ژنی 1kb خریداری شده از شرکت BioRon و چاهک پنجم کنترل منفی. 70
- شکل 4-26- پلاسمید psi-checkII چاهک اول پلاسمید هضم شده، چاهک دوم پلاسمید هضم نشده و چاهک سوم نردبان ژنی 1kb خریداری شده از شرکت BioRon. 71
- شکل 4-27- انجام کلونی PCR روی کلون های Sox-1، چاهک 4 و 8 و 12 کلون مثبت از کلونینگ ژن Sox-1 و چاهک های 1 و 2 و 3 و 5 و 6 و 7 و 9 و 10 و 11 و 13 و 14 کلون منفی این کلونینگ می باشند. چاهک 15 چپ نردبان ژنی 1kb شرکت BIORON. 72
- شکل 4-28- انجام کلونی PCR روی کلون های Bcl2L1، چاهک 5 و 8 و 9 و 11 و 12 و 13 کلون مثبت از کلونینگ Bcl2L1 و چاهک 2 و 3 و 4 و 6 و 7 و 10 کلون منفی این کلونینگ میباشند. چاهک 1 از چپ نردبان ژنی 100bp شرکت BIORON. 72
- شکل 4-29- انجام کلونی PCR روی کلون های LINGO-1، چاهک های 2 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 و 11 و 12 و 13 کلون مثبت از کلونینگ ژن LINGO-1 می باشند و چاهک های 3 و 14 و 15 کلون منفی از این کلونینگ. چاهک اول نردبان ژنی 100bp خریداری شده از شرکت BioRon. 73

- شکل 4-30- نشان دهنده سلول های HEK 293T زیر میکروسکوپ فلورسنت می باشد. در این شکل سلول ها با وکتور psi-checkII/LINGO-1 و pLentIII-miR-184 ترانسفکت شده اند که با نور فلورسنت و مرئی به صورت هم زمان و نور فلورسنت مشاهده می شوند. این تصویر شکل ظاهری سلول های HEK 293T را پس از ترانسفکت نشان می دهد..... 75
- شکل 4-31- نشان دهنده سلول های HEK 293T زیر میکروسکوپ فلورسنت می باشد. در این شکل سلول ها با وکتور psi-checkII/Sox-1 و pLentIII-miR-184 ترانسفکت شده اند و با نور فلورسنت مشاهده می شوند. این تصویر شکل ظاهری سلول های HEK 293T را پس از ترانسفکت نشان می دهد..... 75
- شکل 4-32 بررسی نتایج لوسیفرز روی ژن Bcl2L1، LINGO-1 و Sox-1..... 78
- شکل 4-33- نتایج RT-PCR روی مغز جنین موش 77

فهرست واژگان

میکرو ریبونوکلئیک اسید	microRNA
سدیم دی سولفید پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز	SDS-PAGE
تمایز	differentiation
تکثیر	Expantional
واکنش زنجیره ای پلیمرز	PCR
لکه گذاری پروتئین پروتئین	Western blotting
دئوکسی ریبو نوکلئیک اسید	DNA
واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی	Real Time PCR
سلول بنیادی پیش ساز عصبی انسانی	Human Neural Progenitor Stem CELL
وارد کردن پلاسمید به سلول	Transfection
وارد کردن ویروس به سلول	Transduction
وارد کردن پلاسمید داخل باکتری	Transformation
ویروس سازی	Virus packaging
بیماری مولتیپل اسکلروزیس	MS disease
سنجش لوسیفرز	Luciferase assay

چکیده

MS یک بیماری مزمن و التهابی است که در سیستم عصبی مرکزی رخ می دهد. در این بیماری سلول های الیگودندروسیتی و آکسون ها دچار آسیب می شوند. این نکته قابل ذکر است که دلیل اصلی بروز بیماری MS مشخص نشده است. حضور سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی (OPC) در نواحی آسیب دیده مغزی، نشان از ترمیم نواحی آسیب دیده می باشد که این ترمیم در طول دوره بیماری دچار نقص شده است. همین امر سبب ارائه پیشنهاد استفاده از این دسته سلول ها برای ترمیم نواحی آسیب دیده شده است. اگرچه این روش موفقیت آمیز بوده اما به دلیل کارآیی پایین و مدت زمان طولانی تمایز ایت دسته از سلول ها، دانشمندان به روش های مولکولی از جمله استفاده از میکروRNAها روی آوردند. میکروRNAها، مولکول های کوچک غیر کدکننده ای هستند که با شکست و یا مهار ترجمه mRNA هدف خود، نقش تنظیمی مهمی را در فرآیندهای متعدد سلولی بازی می کنند. در این مطالعه نیز سلول های بنیادی پیش ساز عصبی (hNPSC) توسط لنتی ویروس های حاوی miR-184 به منظور القای مسیر تمایزی الیگودندروسیتی، ترانسداکت شدند. نتایج RT-PCR نشان دهنده کاهش بیان ژن های هدف این میکروRNA، Bcl2L1، RNA LINGO-1 و Sox-1، هم چنین افزایش بیان ژن های ویژه الیگودندروسیتی، Olig2 و MBP، می باشد. در پیرو تأیید بیش تر از این نتایج، آزمایش های وسترن بلاتینگ و ایمونوسیتوکمیستری نیز انجام شد. در نهایت، مطالعات حیوانی انجام شده، نتایج مطالعات سلولی و مولکولی ذکر شده را مورد تأیید قرار داد. در نتیجه، استفاده از miR-184، برای القای مسیر تمایزی الیگودندروسیتی در سلول های NPSC، می تواند روش پیشنهادی مؤثرتری واقع شود.

کلمات کلیدی: MS، میکروRNA، سلول های بنیادی پیش ساز عصبی انسانی، الیگودندروسیت

ها، سیستم عصبی مرکزی، تمایز، ترانسداکت، تولید لنتی ویروس ها

فصل اول

مقدمه

دیدگاه بنیادین که در گذشته رایج بود و عنوان می کرد که تنظیم پروسه های سلولی تنها از طریق فاکتورهای پروتئینی صورت می پذیرد امروزه دچار تغییر شده است (Kugel and Goodrich 2012). این تغییر دیدگاه تا حدود زیادی مربوط به کشف و تعیین عملکرد RNA های غیرکدشونده (ncRNA)¹ در مکانیسم های مختلف و مهم سلولی مربوط می شود. از طرف دیگر اختراع دستگاه های توالی یابی با توان عملیاتی بالا² نشان داد بخش اعظم DNA ژنومی پستانداران رونویسی می شود (Birney, Stamatoyannopoulos et al. 2007, Kapranov, Cheng et al. 2007, Kapranov, Willingham et al. 2007).

این موضوع این سؤال را پیش می آورد که آیا تمامی رونوشت هایی که از روی DNA رونویسی می شوند عملکرد دارند یا به طور ساده این رونوشت ها خطاهای رونویسی در سیستم پستانداران می باشند. اگرچه هنوز به طور کامل به این سؤال پاسخ داده نشده است، اما به روشنی مشخص گردیده است که تعدادی از این RNA ها که ترجمه هم نمی شوند و در واقع ncRNA هستند عملکردهای زیستی مهمی در سلول ایفا می کنند و هر روز بر تعداد این ncRNA ها افزوده می شود. RNA های غیرکدشونده را می توان به دو دسته کلی ncRNA های کوچک مانند میکروRNA ها (miRNA) و ncRNA های بلند (lncRNA)³ تقسیم بندی کرد که در این پروژه روی میکروRNA ها و نحوه عملکرد آن ها در تمایز سلول های بنیادی تمرکز بیش تری شده است.

1-1 micro RNA ها:

miRNA ها گروه جدیدی از ریبونوکلیک اسیدهای غیرکدکننده و تک رشته هستند که از نظر تکاملی محافظت شده اند و دارای طولی برابر 18-25 نوکلئوتید می باشند (Garro and Murugaiyan 2016). تا کنون نقش آن ها در تنظیم پروسه های سلولی و نموی مختلف از قبیل رشد، سیکل سلولی، نمو، تمایز، متابولیسم، آپوپتوز، رگ زایی و التهاب مشخص شده است (Hadjiargyrou, Zhi et al. 2016). miRNA با تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی، اثر خود را اعمال می کند به طوری که با تخریب و یا مهار ترجمه mRNA از تولید پروتئین، جلوگیری به عمل می آورد (Bartel 2004, Bartel 2009). تا کنون بیش از 1700 miRNA از 142 گونه در پایگاه داده (http://www.mirbase.org) miRNA(miRBase) ثبت شده است که حدود 1048 عدد از آن ها miRNA انسانی است (Kozomara and Griffiths-Jones 2011). این در حالی است که تنها عملکرد بیولوژیک برخی از آن ها مشخص شده است؛ به علاوه هر miRNA معمولاً چندین mRNA را مورد هدف قرار می دهد (Bartel 2009).

¹ Non-coding RNA

² High-through put

³ Long non-coding RNA

1-2 تولید زیستی¹ میکرو RNA ها :

پردازش و تکامل miRNA طی سه مرحله رونویسی، بالغ سازی و تجزیه صورت می‌گیرد که در هسته و سیتوپلاسم رخ می‌دهند. ژن های کدکننده miRNA، در داخل نواحی اینترونی و یا به صورت مستقل در ژنوم دیده می‌شوند (Cummins, He et al. 2006, Kota, Chivukula et al. 2009, Macfarlane and Murphy 2010, Nugent, Miller et al. 2011, Ha and Kim 2014). رونویسی از ژن های کد کننده miRNA توسط RNA Polymerase II در هسته انجام می‌شود (Borchert, Lanier et al. 2006). رونوشت اولیه miRNA به نام Pri-miRNA، قطعه RNA تک رشته ای بلند با طول متفاوت (معمولاً 1 تا 3 کیلو جفت باز) به همراه کلاهیک در 5' و دم پلی A در 3' است (Lee, Kim et al. 2004, Saini, Griffiths-Jones et al. 2007, Garzon, Marcucci et al. 2010, Conrad, Marsico et al. 2014). Pri-miRNA پس از تولید در هسته، می‌تواند به یک یا تعداد بیشتری miRNA که اصطلاحاً precursor miRNA (pre-miRNA) نام دارند، پردازش و بالغ سازی شود. پردازش Pri-miRNA توسط کمپلکس پروتئینی به نام کمپلکس ریز پردازش گر² انجام می‌شود (Macias, Cordiner et al. 2015) که متشکل از نوعی آنزیم RNase III هسته ای به نام Drosha به همراه پروتئین متصل شونده به RNA دو رشته به نام فاکتور DGCR8³ معروف به (Pasha) می‌باشد (Denli, Tops et al. 2004, Han, Lee et al. 2004, Landthaler, Yalcin et al. 2004, Zeng, Yi et al. 2005, Saini, Griffiths-Jones et al. 2007, Macfarlane and Murphy 2010). کمپلکس با برش Pri-miRNA، موجب ایجاد ساختار سنجاق سر⁴ در pre-miRNA می‌شود (Lee, Ahn et al. 2003, Landthaler, Yalcin et al. 2004). پس از این مرحله از بالغ سازی، مولکول pre-miRNA به وسیله Exportin-5 از هسته به سیتوپلاسم منتقل می‌شود (Bohnsack, Czaplinski et al. 2004, Castilla-Llorente, Nicastro et al. 2013). ادامه بالغ سازی miRNA در سیتوپلاسم و توسط آنزیم RNase III سیتوپلاسمی به نام Dicer صورت می‌گیرد. این آنزیم با برش ساختار سنجاق سر موجب تشکیل miRNA دورشته ای بالغ با طول بین 20 تا 25 نوکلئوتید به نام miRNA duplex، می‌شود (Ketting, Fischer et al. 2001, Lee, Nakahara et al. 2004, Yi, Arthanari et al. 2015, Magner, Weinstock-Guttman et al. 2016). سپس دو رشته miRNA duplex از هم باز می‌شوند و یک رشته آن که اصطلاحاً به آن رشته راهنما⁵ می‌گویند، طی فرآیندی به نام بارگذاری یا گردهمایی RNA⁶ به پروتئین Argonaute 2 (Ago2) متصل می‌شود در حالی که رشته مکمل که به آن رشته ستاره و یا رشته مهاجر⁷ می‌گویند تجزیه و تخریب می‌شود. کمپلکسی که شکسته

¹ Biogenesis

² Microprocessor complex

³ Human DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR)

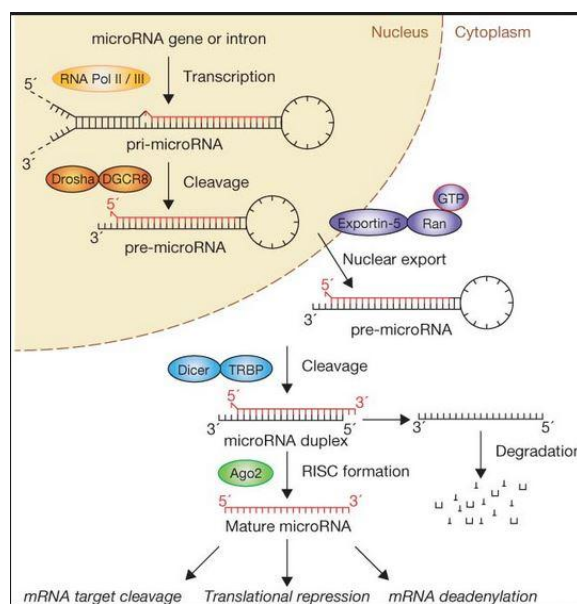
⁴ Hairpin Structure

⁵ Guide strand

⁶ RNA loading or assembly

⁷ Star strand or passenger strand

شدن کاتالیتیک miRNA را موجب می شود، کمپلکس RNA-induced silencing complex (RISC) نام دارد و کمپلکسی که مهار ترجمه ای با واسطه miRNA را بر عهده دارد، micro-ribonucleoprotein complex (miRNP) می باشد (Mourelatos, Dostie et al. 2002, Maniataki and Mourelatos 2005, Farazi, Juranek et al. 2008, Bronevetsky and Ansel 2013, Ohtsuka, Ling et al. 2015). به این ترتیب microRNA بالغ تک رشته ای به کمپلکس RISC متصل باقی مانده و سپس به کمپلکس miRNP می پیوندد. miRNA در کمپلکس miRNP- RISC می تواند با ناحیه 3'UTR در mRNA هدف مکمل شود. جفت شدن کامل با mRNA هدف، موجب تجزیه آن می شود در صورتی که جفت شدن نسبی با mRNA هدف تنها موجب مهار ترجمه آن می گردد (Gregory, Chendrimada et al. 2005, Harfe 2005, Wienholds and Plasterk 2005). آخرین مرحله از تکامل RNAi، تجزیه آن است که می تواند از انتهای 5' به سمت 3' توسط Exoribonuclease XRN2 Enzyme و یا از انتهای 3' به سمت 5'، توسط اگزونوکلینازهای معمول مثل Human Polynucleotide Phosphorylase و Nuclear Exosome صورت گیرد (Davis and Hata 2009, Hu and Gatti 2011). در شکل 1-1 نحوه بیوستز و تکامل miRNA در سلول نشان داده شده است.



شکل 1-1: بیوژنز miRNA: رونویسی از ژن های کدکننده miRNA در هسته و به فرم pri-miRNA انجام می شود. کمپلکس Drosha-DGCR8 اولین مرحله پردازش را بر روی pri-miRNA انجام داده و آن را به فرم pre-miRNA می آورد که در مرحله بعد توسط Exportin-5/Ran GTP از هسته به سیتوپلاسم منتقل می شود. در سیتوپلاسم pre-miRNA توسط Dicer به دوپلکس miRNA پردازش می شود. از دوپلکس miRNA رشته روی کمپلکس RISC بارگذاری می شود می تواند با اتصال به mRNA هدف موجب تخریب و یا مهار ترجمه آن شود (Winter, Jung et al. 2009)

¹ 3' Untranslated region

1-3 شناسایی مولکول های هدف میکرو RNA :

یکی از مهم ترین مباحث مربوط به میکرو RNA شناسایی مولکول های هدف می باشد. ایجاد تعداد کمی جفت باز مکمل برای برهمکنش عملکردی بین میکرو RNA و توالی مولکول هدف ضروری است. در اغلب موارد، ایجاد جفت باز مکمل در 6-7 نوکلئوتید صورت می گیرد که معمولاً شامل نوکلئوتیدهای 2 تا 9 از انتهای 5' میکرو RNA هستند و به این ناحیه «seed» می گویند (Farazi, Hoell et al. 2013). بقیه بازهای میکرو RNA ظرفیت جفت شدن محدودی با توالی های 3'UTR مجاور جایگاه seed نشان می دهند و همین اتصالات گذرا به میکرو RNA اجازه اتصال به چندین جایگاه درونی در یک 3'UTR می دهد. از روش های محاسبه ای متفاوتی برای پیش بینی جایگاه های هدف میکرو RNA استفاده می شود که شامل الگوریتم های کامپیوتری است اما چون جفت شدگی با توالی هدف به صورت ناقص و محدود است، پیش بینی دقیق جایگاه هدف میکرو RNA هنوز دشوار است. یکی از الگوریتم های پیش بینی کننده مولکول هدف، بر مبنای جفت شدگی و حفاظت شده بودن توالی seed میکرو RNA در 3'UTR های گونه های متفاوت، طراحی می شود (Wiemer 2007). mRNAهایی که به طور ترجیحی با 7-8 نوکلئوتید از توالی seed جفت می شوند، براساس معیارهایی مثل حفاظت شده بودن تکاملی توالی هدف و پایداری ترمودینامیکی برهمکنش های صورت گرفته بین مابقی بازهای میکرو RNA و توالی های دو طرف آن در 3'UTR طبقه بندی می شوند. در نوع دیگری از جفت شدن میکرو RNA:mRNA هدف، جفت شدن ناقص در ناحیه 5'-seed صورت می گیرد، اما از طریق جفت شدن یک باز اضافی در انتهای 3' میکرو RNA، جبران می شود (Voorhoeve and Agami 2007). مطالعات بیوانفورماتیکی و نرم افزارهای متعددی، به منظور تشخیص هدف های میکرو RNA از روی توالی seed به کار رفته اند. برای مثال 1000 ژن میکرو RNA برای 1 درصد ژنوم انسان تخمین زده شده است و این احتمال وجود دارد که بیش از یک سوم ژنوم انسان توسط میکرو RNA تنظیم شود (Bussing, Slack et al. 2008, Kanellopoulou and Monticelli 2008, Cho 2010, Cho 2010, Babashah and Soleimani 2011, Hanahan and Weinberg 2011, Giovannetti, Erozenski et al. 2012).

در این تحقیق mRNAهای هدف miRNA مورد نظر، با استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیکی Target scan شناسایی شدند و در آزمایش های مختلفی بررسی شدند.

1-4 توزیع بافتی میکرو RNA ها:

میکرو RNA ها در سلول های بافت های مختلف، مایع پلازما و دیگر مایعات بدن مانند ادرار، اشک و مایع آمنیون به شکل پایدار و به صورت متصل به کمپلکس خاموش کننده القاء شده توسط RNA (RISC) یافت می شوند. به این ترتیب، میکرو RNA ها از دسترس فعالیت RNase های با منشاء داخلی محافظت می شوند و به همین دلیل است که میکرو RNA ها به شرایط سخت مقاوم اند. تبادل میکرو RNA با سلول های دیگر با واسطه آگزوزوم هایی¹ انجام می شود که در داخل سلول

¹ Exosomes

بسته بندی می شوند. میزان میکرو RNA تعیین شده در سرم و رده های سلولی متفاوت است که این اختلاف به این دلیل می باشد که میکرو RNA موجود در سرم، محصول تخریب سلول تومور یا شکل فعال اگزوزوم های در حال انتقال هستند. تفاوت مشاهده شده بین میزان میکرو RNA بافت و سرم نیز به مکانیسم آزادسازی میکرو RNA های بافت به جریان خون نسبت داده می شود. الگوی سرمی میکرو RNA در سرم مردان و زنان سالم یکسان می باشد که نشان دهنده عدم ارتباط این الگوی سرمی با جنسیت است (Lei, Luo et al. 2009, Ludwig, Leidinger et al. 2016).

1-5 نقش میکرو RNA ها در بیماری های مختلف:

امروزه موضوع بررسی میکرو RNA ها و شناسایی بیان و عملکرد آن ها در طیف گسترده ای از بیماری های انسان شامل انواع مختلف سرطان، عفونت، التهاب های مزمن و بیماری های خودایمنی مورد توجه قرار گرفته است (Dai and Ahmed 2011). الگوی بیانی بعضی میکرو RNA ها، اطلاعاتی را در مورد عملکردهای آن ها در دسترس قرار می دهد. بعضی از میکرو RNA ها دارای بیان اختصاصی در اندام خاصی هستند، بنابراین در ایجاد یا حفظ سرنوشت سلولی در طول تکوین جنین اهمیت دارند (Sonkoly, Stahle et al. 2008, Guo, Maki et al. 2014). علاوه بر این، با توجه به پراکندگی میکرو RNA ها در سرم و سایر مایعات بدن مانند مایع مغزی-نخاعی و غیره، امید زیادی وجود داشت که بتوان از آن ها به عنوان شناساگرهای زیستی دقیقی در تشخیص زود هنگام انواع بیماری ها مانند سرطان، دیابت، MS و غیره استفاده نمود و امروزه این موضوع تا حدی به مرحله عمل و کاربرد رسیده است (Dai and Ahmed 2011).

1-5-1 نقش میکرو RNA ها در سرطان:

در دو دهه گذشته مشخص شده است که میکرو RNA ها در بیماری های مختلفی مانند بیماری های سیستم ایمنی، سیستم عصبی، انواع سرطان و غیره نقش دارند. بنابراین کشف نقش تنظیمی میکرو RNA ها، نه تنها به مشخص تر شدن نحوه بیان و عملکرد ژن های موجودات و از جمله انسان در طی تکوین و رشد موجودات کمک می کند، بلکه می تواند در تشخیص و درمان بیماری ها نیز به عنوان بیومارکرها¹ یا شناساگرهای زیستی کاربرد داشته باشد (Coolen and Bally-Cuif 2009, Dai and Ahmed 2011, Deng, Deng et al. 2015). از طرف دیگر، مطالعات دیگری با به کار گرفتن آنتاگونیست های میکرو RNA ها با نام اختصاری آنتاگومیر² موجب کاهش میزان میکرو RNA های افزایش یافته در بیماری هایی مانند سرطان می شوند (Krutzfeldt, Rajewsky et al. 2005, Lin and Ying 2013, Deng, Deng et al. 2015).

1-5-2 نقش میکرو RNA ها در بیماری های خود ایمنی:

بیان miRNA در سطح رونویسی توسط فاکتور های رونویسی در طی نمو یا در پاسخ به سیگنال های محیطی، کنترل می شود. اختلال در تنظیم بیان³ و یا عملکرد miRNA با

¹ Biomarkers

² Antagomir

³ Dysregulation

بروز بیماری های مختلف از قبیل بیماری های تخریب کننده اعصاب¹ و بیماری های خود ایمنی مرتبط است (Kanwar, Mahidhara et al. 2010, Sonntag 2010).

تقریباً 60 درصد میکرو RNA هایی که تا به امروز در انسان شناسایی شده اند، در سیستم عصبی مرکزی بیان می شوند. تحقیقات اخیر نشان داده اند که تنظیم بیان ژن با واسطه میکرو RNA ها برای نوروژن زایی²، تمایز سلول های شوان³ و اولیگودندروسیت⁴ و حفظ میلین ضروری است (Schratt, Tuebing et al. 2006, Coolen and Bally-Cuif 2009, Cohen, Lee et al. 2011). الگوی زمانی و مکانی بیان میکرو RNA ها در سیستم عصبی مهره داران متغیر است و این موضوع، نشان دهنده نقش میکرو RNA ها در الگوی تشکیل سیستم عصبی است (Coolen and Bally-Cuif 2009).

در پی تشکیل سیستم عصبی، شواهد دیگری نیز وجود دارد که تحریک سلول های عصبی و یا اثر دادن فاکتور رشد BDNF در موش موجب بیان miR-132 و miR-134 می شود و این دو میکرو RNA در رشد زواید عصبی نقش مهمی را ایفا می کنند. در این مطالعات نشان داده شده است که تحریک سلول های عصبی موجب فعال شدن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم-کالمودولین (CamKII) می شود و آن هم با فسفریلاسیون فاکتورهای رونویسی موجب افزایش بیان miR-132 و miR-134 در جسم سلول عصبی می شود که آن ها هم به نوبه خود با تنظیم بیان پروتئین های دیگری موجب رشد زواید دندریتی و نوروژن زایی می گردند (Lee, Kim et al. 2004, Garzon, Marcucci et al. 2010). هم چنین تحریک نورونی با واسطه NMDA موجب افزایش بیان miR-219 می شود و این میکرو RNA باعث تنظیم تحریک پذیری نورون با واسطه CamKII می شود. این احتمال مطرح شده است که miR-219 در نهایت موجب تنظیم بیان گیرنده های NMDA در ناحیه سیناپس و در نتیجه تنظیم تحریک پذیری عصبی می شود (Zhao, He et al. 2010, Li and Yao 2012, Svaren 2014).

سلول های شوان در سیستم عصبی محیطی و سلول های الیگودندروسیت در سیستم عصبی مرکزی⁵ نقش اصلی را در ساختن غلاف میلین بر عهده دارند و از این طریق نقش مهمی در عملکرد طبیعی اعصاب ایفا می نمایند. وجود میلین در آکسون های میلین دار موجب ایجاد هدایت جهشی و در نتیجه هدایت سریع پیام های عصبی می شود. مطالعات اخیر نقش مهمی را برای میکرو RNA ها در تکثیر، تمایز و میلین سازی توسط سلول های شوان و الیگودندروسیت گزارش کرده اند (Dugas and Notterpek 2011). موش های فاقد آنزیم Dicer1 که یک آنزیم کلیدی در تولید میکرو RNA می باشد، دچار نقص شدیدی در میلین سازی می شوند و این موضوع نقش میکرو RNA ها را در تمایز سلول های شوان و الیگودندروسیت نشان می دهد.

¹ neurodegenerative disease

² Neurogenesis

³ Schwann cells

⁴ Oligodendrocyte

⁵ Central nervous system

با وجود این که سلول های شوان در اعصاب محیطی و الیگودندروسیت ها در اعصاب مرکزی وظیفه میلین سازی را بر عهده دارند، اما بعضی جنبه های بیان و تنظیم میکرو RNA ها در این دو نوع سلول مشابه است. این موضوع نشان می دهد احتمالاً میکرو RNA های مشابهی در تمایز سلول های میلین ساز نقش داشته باشند (Dugas and Notterpek 2011, He, Yu et al. 2012). برای اثبات این فرضیه، مطالعات متعددی روی چندین میکرو RNA شامل miR-219، miR-338 و miR-138 RNA های عضو دسته miR-17-92 انجام شد و نشان داده شده که این میکرو RNA ها در پیش سازهای الیگودندروسیتی به میزان زیادی بیان می شوند و با هدف قراردادن ژن های خاصی موجب تمایز آن ها به الیگودندروسیت می شوند (Zhao, He et al. 2010, He, Yu et al. 2012). تشکیل غیرطبیعی و یا اختلال در حفظ میلین موجب مختل شدن هدایت پیام عصبی و در نهایت موجب تحلیل رفتن اعصاب و اختلال در فعالیت های عصبی می شود (Svaren 2014). بنابراین از آنجا که میکرو RNA ها در سلول های عصبی و گلیال نقش مهمی در تنظیم بیان ژن در سطوح پس از رونویسی دارند، تغییر در میزان بیان آن ها در سیستم عصبی می تواند زمینه را برای بیماری های عصبی مانند بیماری های تحلیل برنده اعصاب از جمله بیماری مالتیپل اسکلروزیس¹ (MS) فراهم نماید.

میکرو RNA ها به عنوان یکی از مکانیسم های اصلی اپی ژنتیک در تنظیم بیان ژن در نظر گرفته می شوند و نشان داده شده که عملکرد مناسب آن ها در تنظیم بیان ژن های دخیل در تکوین سلول ها و پاسخ های ایمنی ضروری است. اطلاعات به دست آمده نشان می دهند که بیان مناسب و عملکرد میکرو RNA ها برای تمایز و عملکرد ماکروفاژها، گرانولوسیت ها و سلول های B و T ضروری هستند و تنظیم بیان میکرو RNA ها به شدت برای حفظ هومئوستاز ایمنی مهم است؛ پس طبیعی است که اختلال در بیان میکرو RNA ها سبب ایجاد بیماری های خودایمنی شود. به عنوان مثال، نقش miR-146a در تنظیم ایمنی ذاتی توسط فعالیت غیرطبیعی مسیر اینترفرون نوع I، نقش miR-125a توسط مهار² KLF13 و³ RANTES در پاسخ های التهابی و نقش miR-21 و miR-148a در مکانیسم های تنظیمی چندگانه تمایز سلول و تنظیم ایمنی، در صورت عملکرد نامناسب این میکرو RNA ها، پتانسیل ایجاد بیماری های خودایمنی بالا می رود (Sonkoly, Stahle et al. 2008, Wang, Chen et al. 2016).

بر این اساس برآورد می شود حدود نیمی از ژن های دخیل در ایمنی ذاتی و اکتسابی تحت کنترل و تنظیم miRNA هستند. اختلال در تنظیم بیان miRNA در چندین بیماری خود ایمنی نظیر systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, MS گزارش شده است (Alevizos and Illei 2010, Furer, Greenberg et al. 2010, Hedrich and)

¹ Multiple sclerosis

² Kruppel-like factor 13

³ Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

(Tsokos 2011). بنابراین با توجه به توانایی miRNA در تنظیم حیات و یا مرگ لنفوسیت های T و B، به نظر می رسد miRNA می تواند نقش مهمی در بیماری زایی بیماری های خود ایمن از جمله مولتیپل اسکلروزیس داشته باشد (Pauley, Cha et al. 2009, Jeker and Bluestone 2010).

امروزه چالش های زیادی برای کشف شناساگرهای زیستی در تشخیص دقیق و ارزیابی فرآیندهای التهابی و تحلیل برنده اعصاب در حال انجام است و میکرو RNAها به دلیل تنظیم بیان ژن در سطوح پس از رونویسی، مولکول های بسیار مهمی به نظر می رسند. از طرفی بعضی از میکرو RNAها می توانند شناساگر زیستی دقیقی برای بیماری MS باشند، تغییرات در عملکرد و موقعیت آن ها در مایعات بدن این بیماران، موضوع بسیاری از تحقیقات جدید است و از طرف دیگر از این میکروRNAها می توان برای جلوگیری از روند پیشرفت بیماری و یا حتی درمان بیماری ها استفاده کرد (Jr Ode et al., 2012) (Kacperska, Jastrzebski et al. 2015).

بررسی های دقیقی که با استفاده از روش های TaqMan RT-PCR و ریز آرایه (میکروآرای¹) انجام شده اند، بیش از صد میکرو RNA را شناسایی کرده اند که به طور متمایزی در سلول های تک هسته ای خون محیطی بیماران مبتلا به MS در مقایسه با گروه سالم بیان می شوند. نام و نوع اثر تعدادی از این میکرو RNAها که نقش آن ها در ابتلا به بیماری MS تأیید شده است، در جدول 1 آورده شده است (Thamilarasan, Koczan et al. 2012).

جدول 1-1: تعدادی از miRNAها که در بیماری MS نقش دارند.

نوع miRNA	نوع سلول بیان کننده	اثر
miR-106b	سلول های T کمکی و تنظیمی	میانجی گری مسیر پیام TGF- β
miR-17	سلول های B، T کمکی و T کشنده	افزایش بیان در سلول های T کمکی بیماران MS
miR-18b	سلول های تک هسته ای خون محیطی	نقش احتمالی در دوره کاهش علائم در بیماران MS
miR-20a	سلول های T کمکی	کاهش معنی دار در بیماران MS در مقایسه با افراد کنترل
miR-25	سلول های T کمکی و تنظیمی	میانجی گری مسیر پیام TGF- β
mir-326	سلول های تک هسته ای خون محیطی	تنظیم تمایز Th-17
miR-34a	یافت مغز	بیان معنی دار در نواحی آسیب دیده عصبی بیماران MS
miR-497	سلول های B، T کمکی و T کشنده	کاهش بیان در سلول های T کمکی بیماران MS

شواهد اخیر، نقش ضروری و اساسی میکرو RNAها در کنترل عملکرد اندوتلیوم سد خونی - مغزی و حفظ یکپارچگی آن ها تحت شرایط التهاب را نشان داده اند. عملکرد ناقص سد خونی - مغزی و نشت پیدا کردن و التهاب سلول های اندوتلیال آن در بیماران MS، موجب تسهیل نفوذ تعداد زیادی از گلبول های سفید به پارانشیم مغز می گردد. این امر سبب از دست رفتن بازگشت ناپذیر میلین،

¹ Microarray

آسیب بافت عصبی و در نهایت موجب اختلال در عملکرد آکسون و هدایت پیام عصبی می شود (Kamphuis, Derada Troletti et al. 2015).

علاوه بر این، بیان متفاوت میکرو RNA ها در زیرمجموعه متفاوت لنفوسیت ها مانند سلول های B، T کمکی، T کشنده و سلول T تنظیمی CD25+ در بیماران مبتلا به MS مشاهده شده است (Engels and Hutvagner 2006). بیان miR-34a نیز در التهاب ایجاد شده در بیماری MS افزایش یافته و با هدف قرار دادن نشانگر غشایی CD47، موجب آزادسازی ماکروفاژها از کنترل پیام مهاری و به دنبال آن سبب افزایش فاگوسیتوز میلین می شود و به این ترتیب در بیماری زایی بیماری MS دخالت می کند (Liu, Ma et al. 2012).

اولین میکرو RNA سرم که به عنوان شناساگر زیستی برای تشخیص بیماری استفاده شد، miR-21 بود که میزان آن در بیماران مبتلا به لنفومای منتشر سلول B بزرگ¹ (DLBCL) در مقایسه با افراد سالم بیشتر بود. در آن مطالعه، از تعیین مستقیم میکرو RNA سرم به عنوان یک شناساگر زیستی، در تشخیص بیماری بر پایه خون و استفاده کلینیکی از آن تأکید شده است (Hedrich and Tsokos 2011).

ارتباط میزان بیان میکرو RNA ها و ژن های کاندید در ابتلا به بیماری MS، این احتمال را تقویت نموده است که میکرو RNA ها نقش مهمی در ابتلا به بیماری MS دارند (Lindberg, Hoffmann et al. 2010). اما در بعضی مطالعات، دخالت تعدادی از میکرو RNA ها در بیماری MS، ناشناخته باقی مانده است و به بررسی های بیشتری نیاز دارد.

پروفایلینگ miRNA ها با بررسی های بیوانفورماتیکی نشان دادند که در مراحل مختلف تمایز سلول ها، بیان میکرو RNA ها نیز متفاوت است. طبق این بررسی ها می توان نتیجه گرفت که هر miRNA در مرحله مشخصی از تمایز نقش دارد که به دلیل هدف های متعدد آن ها می باشد. به عنوان مثال miR-181a، miR-26a، miR-30c از جمله میکرو RNA های با بیان بالا در سلول های الیگودندروسیتی هستند (Lau, Verrier et al. 2008).

1-5-3: نقش میکرو RNA ها در تمایز سلول های بنیادی

بررسی های مختلف، پروفایلینگ miRNA ها را در مراحل تمایزی مورد ارزیابی قرار دادند. از این بررسی ها می توان برای سلول درمانی در بیماری های مختلف استفاده کرد. در این بررسی ها نشان دادند که miRNA-9 و miRNA-21 به میزان زیادی افزایش بیان داشته اند و بر خلاف این دو، miRNA-335 که به عنوان آنتاگونیست miR-21 نیز عمل می کند، کاهش بیان از خود نشان می دهد (Lau, Verrier et al. 2008).

قابل ذکر است که ژن های متعددی در القای تمایز الیگودندروسیتی نقش دارند که بیان برخی از این ژن ها نیز تحت تأثیر بیان میکرو RNA ها قرار می گیرد. از جمله این ژن ها، Sox-10 از خانواده SoxE می باشد که در تنظیم تمایز الیگودندروسیتی نقش مهمی را ایفا می کند. Sox-10 سبب

¹ Diffuse large B-cell lymphoma

سپری شدن صحیح مسیر تمایزی الیگودندروسیتی می شود؛ به این ترتیب که فقدان آن منجر به ایجاد اختلال در تمایز به سمت الیگودندروسیت ها می شود. در تحقیقات نشان داده شده است که بیان هم زمان Sox-10 و Olig-1 به صورت سینرژسمی سبب فعال شدن بیان از ژن MBP می شود. در تحقیقات دیگری حول بررسی پروفایلینگ miRNA ها، نشان داده شده که علاوه بر گروه OPC به نسبت سلول های آستروسیتی بیان بالاتری داشته و بنابراین در روند تمایز الیگودندروسیتی نقش بازی می کنند. در آنالیزهای Real-time PCR این مطالعه نشان دادند که این miRNA ها به میزان 11 تا 16 برابر در الیگودندروسیت ها نسبت به آستروسیت ها بیش تر است (Budde, Schmitt et al. 2010).

بررسی های متعدد در رت مشخص کردند که در مراحل مختلف تمایز miRNA های مختلف بیان متفاوتی از خود نشان می دهند. برای مثال miR-223, miR-338, miR-219, miR-145, miR-378 و miR-214 در الیگودندروسیت ها بیان به شدت بالایی داشته و بر خلاف این میکروRNA ها، miR-192, miR-92, miR-181b, miR-320 و miR-19b بیان بسیار کمی از خود در الیگودندروسیت ها نشان می دهند (Lau, Verrier et al. 2008).



شکل 1-2 پروفایلینگ miRNA ها در مراحل تمایزی (رنگ سبز میزان پایین بیان و رنگ قرمز میزان بالای بیان را نشان می دهد).

در کنار miR-219 و miR-338، miR-138 نیز در تمایز الیگودندروسیتی نقش مهمی را ایفا می کند. در مطالعات نشان داده شده است که این میکروRNA در مراحل اولیه تمایز و در بیان مارکرهای اولیه الیگودندروسیتی نقش دارد (Gupta, All et al. 2011).

تحقیق دیگری پیرامون پروفایلینگ miRNA ها مشخص کرده است که miR-9 به عنوان تنظیم کننده مهم در تمایز سلولی از مرحله OPC (A2B5+/ GalC-) به مرحله الیگودندروسیت اولیه (A2B5+/ GalC+) محسوب می شود. miR-9 بیان PMP22¹ را که توسط سلول های شوان بیان می شود و به عنوان فاکتوری در تشکیل میلین به شمار می رود، کاهش می دهد. همین نتایج نشان دهنده نقش این میکرو RNA در مراحل اولیه الیگودندروسیتی است (Gupta, All et al. 2011). پروفایلینگ miRNA در مراحل مختلف تمایز سلول های بنیادی، در مطالعات ارزیابی شده اند. MiR-199a و miR-145 در مراحل اولیه، میانی و نهایی OPC، miR-214 در مرحله اولیه و میانی OPC و miR-184 و miR-1183 در مرحله پیش ساز گلیالی و اولیه OPC بیان بالایی دارند (Liu et al. 2010). بنابراین با توجه به این تحقیق و دیگر مطالعات پیرامون پروفایلینگ میکروRNA ها، مشخص شد که miR-184 می تواند نقش مهمی را در القای تمایز به سمت الیگودندروسیت ها ایفا کند. در این پروژه نیز تمام سعی ما در اثبات نقش این میکروRNA در مسیر تمایزی الیگودندروسیتی است.

1-6 مسیر تمایزی از سلول های Neural progenitor stem cells به سمت سلول های الیگودندروسیت

سلول های بنیادی عصبی قابلیت تبدیل به سه دسته اصلی سلول های نورونی، آستروسیتی و الیگودندروسیتی را دارند (Asano, Aonuma et al. 2009). الیگودندروسیت ها در سیستم عصبی مرکزی نقش مهمی را با تولید میلین ایفا می کنند. همانگونه که اشاره شد در بیماری MS این سلول ها تخریب می شوند. از روش های ذکر شده برای درمان این بیماری می توان سلول درمانی و مولکول درمانی² را به عنوان روش های ایمن نام برد. در سلول درمانی مهم ترین سلول استفاده شده برای تمایز به سمت الیگودندروسیت ها، سلول های بنیادی پیش ساز عصبی (Neural progenitor stem cells) هستند که بسته به نوع شرایط محیطی می توانند به انواع سلول های عصبی نورونی، آستروسیتی و الیگودندروسیتی تمایز می یابند (Liu et al. 2010, Zhao, He et al. 2010).

در مسیر تمایزی الیگودندروسیتی، سلول های NPSCs ابتدا به سلول های پیش ساز الیگودندروسیت (Oligodendrocyte Precursor Stem Cells [OPCs]) تبدیل می شوند که خود شامل سه مرحله ابتدایی (Early-OPC)، میانی (Mid-OPC) و نهایی (Late-OPC) می باشند. سلول های OPC نیز به سلول های الیگودندروسیت تبدیل می شوند. سلول های OPC پس از مهاجرت به بخش سفید مغز، از چرخه سلولی خارج شده و روند تمایز به سمت الیگودندروسیت های بالغ را طی می کنند. OPC ها به علت دارا بودن قابلیت بالقوه متعدد³،

¹ Peripheral myelin protein

² Molecular therapy

³ Multi-potency

خودتجدیدی¹ و پاسخ های سریع تکثیری به آسیب، از دسته سلول های بنیادی در مطالعات محسوب می شوند (Pfeiffer, Warrington et al. 1993). این سلول ها به میزان بالایی تکثیر می یابند، متحرکند و دوقطبی هستند که به میزان زیادی مارکرهای A2B5 و غیره را بیان می کنند (Sim, Zhao et al. 2004, Watanabe, Hadzic et al. 2004, Fancy, Zhao et al. 2002). بیان این فاکتورها و هم چنین ویژگی های OPCها توسط فاکتورهای رونویسی Olig1 و Olig2 و غیره تنظیم می شود. هم چنین مطالعات نشان می دهند که OPCها در روند تمایز الیگودندروسیتی به فاکتورهایی نظیر Thyroid hormone (T3) و Insulin-like growth factor (IGF)-1 نیز پاسخ می دهند (Tosic, Torch et al. 2004, Jones, Jolson et al. 1992, Watanabe, Hadzic et al. 2003).

علاوه بر این نتایج، این تحقیقات نشان داده اند که تمایز OPCها به عملکرد Olig1, Olig2, Sex-determining Y-box (Sox)-10, NKX2.2, NKX2.6 و غیره نیاز دارد؛ چرا که این فاکتورها با پروموتور ژن های میلین بر هم کنش داده و بنابراین سبب رونویسی و بیان از این ژن می شوند (Nicolay, Doucette et al. 2007).

در تحقیقات انجام شده بر روی روند تمایز سلول ها، از مارکرهای سلول برای بررسی مسیر تمایز و تشخیص سلول ها استفاده می کنند. به عنوان مثال مطالعات ژاو و همکارانش نشان دادند که مارکرهای Olig1, Olig2 در سلول های الیگودندروسیتی بیان بالایی داشته اند (Zhao, He et al. 2010).

NKX2.2 نیز به عنوان فاکتور تنظیمی مهمی در تمایز سلول های پیش ساز الیگودندروسیت، OPCs، می باشد. به این ترتیب که در بخش های دمیلینه شده در مدل موشی که آسیب نخاعی داشتند، تعداد سلول های OPC که NKX2.2 را دارا بودند، کاهش پیدا می کنند. در مطالعه دیگری ژن NKX2.2 به عنوان فاکتور زمانی مشخصی در تمایز الیگودندروسیتی معرفی شد. این مطالعه نشان داد که بیان بالای این ژن در پیش برد سریع OPCها در تمایز الیگودندروسیتی نقش مهمی دارد و با اتصال به فاکتور رونویسی $pdgfra^2$ و کاهش بیان این فاکتور سبب افزایش روند تمایزی به سمت سلول های الیگودندروسیت می شود (Zhu, Zhao et al. 2014) (Suyama, Watanabe et al. 2007). هم چنین مارکر MBP³ به عنوان شناخته شده ترین مارکر الیگودندروسیتی، همانند مارکر GFAP که شناخته شده ترین مارکر آستروسیتی است، در مطالعات مختلف به کار گرفته می شود (Shaltouki, Peng et al. 2013). OPCهای جدا شده از رت در محیط کشت ویژه به سلول های الیگودندروسیتی نابالغ تمایز یافتند و این تشخیص براساس مارکرهای سولفاتید O4، MBP و PLP⁴ انجام شده است (Pedraza, Taylor et al. 2014).

هم چنین تحقیقات دیگری نشان دادند که آسیب های ایجاد شده در بیماری MS قابلیت ترمیم مجدد را ندارند و همین دلیل سبب بروز اختلال در عملکردهای بیولوژیکی می شود. در این تحقیقات

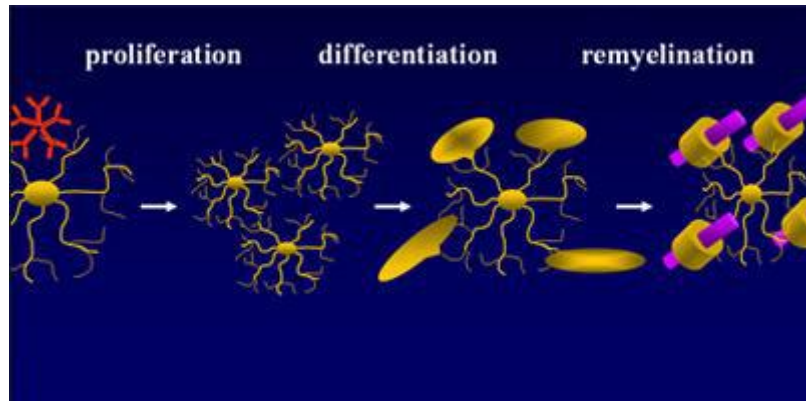
¹ Self-renewal

² Platelet derived growth factor receptor alpha

³ Myelin basic protein

⁴ Proteolipid protein

طبق گفته های قبل، نشان دادند که برای تولید مجدد سلول های الیگودندروسیت تمایز از سلول های پیش ساز آن ها ضروری است. (Miron et al., 2011) دارا نبودن قابلیت ترمیم مجدد آسیب ها به علت ناتوانی سلول های OPC در تکثیر و تمایز در التهاب های مغزی می باشد (Miron, Kuhlmann et al. 2011). با روش های مولکولی می توان میزان تمایز این سلول ها را به سمت سلول های الیگودندروسیت تحریک کرد. در شکل زیر تکثیر و تمایز سلول های بنیادی در زمان آسیب دیدگی میلین مشاهده می شود.



شکل 1-3 مراحل تکثیر و تمایز سلول های بنیادی برای ترمیم میلین آسیب دیده.

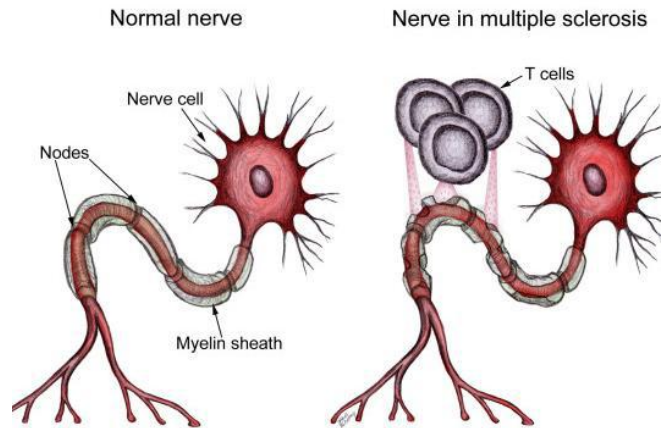
بنابراین می توان نتیجه گرفت که از سلول های OPC, NPSC و یا ESC می توان به عنوان منبع تولیدکننده سلول های الیگودندروسیت آسیب دیده در سلول درمانی بیماری MS استفاده کرد.

1-7 بیماری MS:

مولتیپل اسکلروزیس (MS) رایج ترین بیماری خود ایمن سیستم عصبی مرکزی شامل مغز و نخاع است که با التهاب نوروں ها و تخریب میلین همراه است (Kingwell 2012, Mycko, Cichalewska et al. 2015). در این بیماری دسته ای از سلول های T(CD4+) خود فعال خاص¹، در سیستم ایمنی محیطی فعال می شوند و پس از عبور از سد خونی- مغزی² موجب تخریب غلاف میلین و در نتیجه اختلال در فرآیند انتقال پیام عصبی می شوند (Kasper and Shoemaker 2010, Bahreini, Salmani et al. 2011). این بیماری معمولا در سنین جوانی و میان سالی بروز می کند.

¹ Auto reactive T cells

² Blood-brain barrier

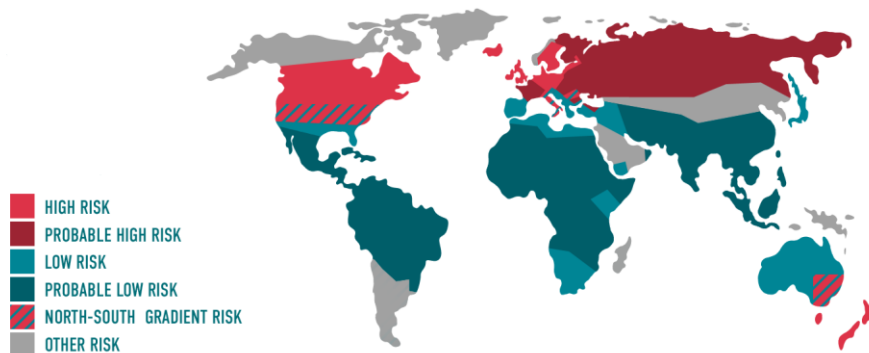


شکل 1-4- سمت چپ: سلول های سالم عصبی. سمت راست: سلول های آسیب دیده توسط T-cell در بیماری MS

نرخ شیوع MS و الگوی پراکندگی جغرافیایی آن یکی از نشانه های اپیدمیولوژیکی بیماری می باشد. به طور معمول میزان شیوع این بیماری در جمعیت هایی که در نزدیکی خط استوا زندگی می کنند کمتر است. در طول جغرافیایی به سمت دو نیمکره شمالی و جنوبی میزان مبتلایان به بیماری ام اس افزایش می یابد. این بیماری در کشورهای شمال اروپا، بویژه کشورهای اسکاندیناوی و بریتانیا، شمال آمریکا و جنوب کانادا شیوع بالایی دارد (Pugliatti, Sotgiu et al. 2002, Saadatnia, Etemadifar et al. 2007,) (Etemadifar and Maghzi 2011, Leray, Moreau et al. 2016).

براساس میزان شیوع نواحی جغرافیایی، سه دسته تقسیم بندی می شوند:

1. میزان شیوع بالا: بیش از 30 نفر در 100,000 نفر
2. میزان شیوع متوسط: بین 5 تا 25 نفر در 100,000 نفر
3. کم ریسک: کمتر از 5 نفر در 100,000 نفر



شکل 1-5- تقسیم بندی پراکندگی جغرافیایی ام اس در جهان.

اگرچه علت دقیق بیماری MS مشخص نشده است اما مطالعات مختلف نشان می دهند برهمکنش عوامل ژنتیکی (نوع گیرنده HLA) و عوامل محیطی با یکدیگر در بیماری زایی نقش دارند (Hoffjan and Akkad 2010, Bahreini, Salmani et al. 2011,) (Bhatia, Bali et al. 2015).

علائم مولتیپل اسکلروزیس ناشی از قطع مسیر میلین در سیستم عصبی مرکزی در اثر تخریب پوشش میلین است؛ علائم ابتدایی می تواند به صورت یک یا تعدادی از موارد زیر بروز کند: 1) تضعیف یا کاهش چابکی و چالاکی در یک یا تعدادی از ارگان های حرکتی (دستها و پاها) 2) اختلال در سیستم حسی 3) زوال بینایی مونوکولار¹ 4) دو بینی² (Hoh and Beisse 2014) 5) بی ثباتی در راه رفتن 6) ناهماهنگی حرکتی³. هر یک از علائم می توانند به صورت ناگهانی و یا تدریجی باشند. تشخیص کلینیکی می تواند به وسیله ی تکنولوژی تصویر برداری رزونانس مغناطیسی⁴ صورت گیرد که پلاک ها یا ضایعات متعدد و غیر متقارن (محل های تخریب میلین) در سرتاسر ماده سفید CNS و به ویژه در ناحیه کورپوس کالازوم و نواحی عمقی بطن های مغز را در افراد مبتلا نشان می دهد (Hauser and Oksenberg 2006). با وجود اینکه فنوتیپ بیماری MS میتواند از یک بیماری خوش خیم تا یک بیماری به سرعت پیش رونده و ناتوان کننده باشد، با این حال اکثر بیماران مبتلا در نهایت با ناتوانی پیش رونده روبه رو می شوند. از این رو بر اساس ناتوانی نورولوژیک می توان بیماران را به 4 گروه تقسیم کرد:

1- پیش رونده ابتدایی (primary-progressive)

2- پیش رونده ثانویه (Secondary- progressive)

3- عود کننده - بهبود پذیر (Relapsing-remitting) (Almas, Vance et al. 2016)

4- عود کننده - پیش رونده (Progressive-relapsing)

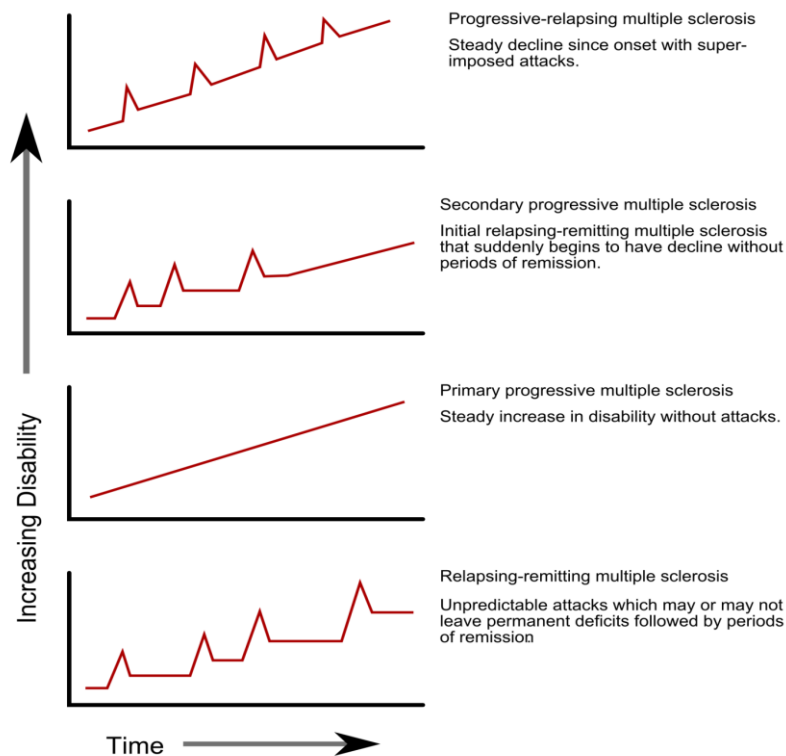
تقریباً 85 درصد از بیماران الگوی RR-MS را نشان می دهند؛ الگوی فنوتیپی بیماری در این حالت به صورت بروز ناگهانی علائم و بدتر شدن آنها (فاز عود یا Relapse) می باشد که به دنبال آن بهبودی نسبی یا کامل (فاز بهبودی یا Remission)، حاصل می شود. حدود 50 درصد از بیماران RR-MS به فرم SP-MS تغییر وضعیت می دهند (معمولاً پس از 10 سال)؛ اکثراً این اتفاق زمانی می افتد که سرعت زوال میلین و آکسون از توانایی CNS جبران و ساخت آن ها، پیشی بگیرد که در این حالت پیشرفت تدریجی ناتوانی دیده می شود. 10 درصد از بیماران از همان ابتدا پیشرفت تدریجی ناتوانی را نشان می دهند (فرم PP-MS). فرم دیگر، PR-MS است که حدوداً در 5 درصد از بیماران دیده می شود و در این حالت بیماران از ابتدا پیشرفت تدریجی ناتوانی را نشان می دهند که در ادامه با یک یا تعداد بیشتری عود یا تشدید همراه است (Goodin 2006, Hauser and Oksenberg 2006, Rudick, Lee et al. 2006). در شکل 1-6 دوره های بالینی بیماری MS نشان داده شده است.

¹ Monocular visual loss (optical neuritis)

² Diplopia

³ Ataxia

⁴ Magnetic resonance imaging



شکل 1-6- دوره های بالینی MS

همانگونه که ذکر شد تا به امروز دلیل قطعی بروز این بیماری مشخص نشده است و از نظر پزشکی تا زمانی که علت اصلی یک بیماری مشخص نباشد نمی توان درمان قطعی برای آن بیماری نیز در نظر گرفت، اما با این وجود؛ کمپانی های دارویی، داروهای متعددی را برای جلوگیری از پیشرفت این بیماری از جمله اینترفرون β ، کورتیکواستروئیدها و Natalizumab تولید کرده اند. در کنار این داروها که به عنوان درمان نمی توان از آن ها یاد کرد، مطالعات متعددی بر روی روش های سلول درمانی¹ به انجام رسیده است. با بررسی هایی که روی پروفایلینگ miRNA ها انجام شده است، این فرضیه که از miRNA ها بتوان به عنوان متد جدیدی برای درمان بیماری MS، استفاده کرد، معرفی شده است.

برای کسب اطلاعات لازمه در درمان این بیماری، روش های به کار گرفته شده برای مطالعه بیش تر بر روی مدل حیوانی و آزمایشگاهی این بیماری،² EAE است (Weiner 2009, Mix,) می توان در انواع گونه های حیوانی (حتی پریمات ها) و به وسیله ایمنی زایی با پروتئین های میلین و یا مشتقات پتیدی آن ها، ایجاد کرد. بیماری EAE ویژگی های کلینیکی، هیستولوژی، ایمونولوژیک و ژنتیکی مشابه و مشترکی با بیماری MS دارد و از این رو به طور

¹ Cell therapy

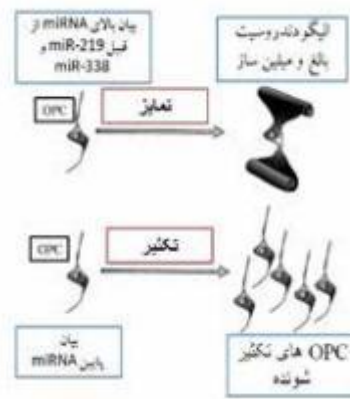
² Experimental autoimmune encephalopathy

گسترده ای به عنوان مدل بیماری حیوانی MS ، در نظر گرفته می شود (Steinman and Zamvil 2006).

در بیماری MS سلول های الیگودندروسیت آسیب می بینند که این سلول ها از دسته سلول های سیستم عصبی-مرکزی می باشند و تولید میلین را برعهده دارند و قابل ذکر است که آسیب های ناشی از بروز بیماری در اثر تخریب میلین می باشد. بنابراین می توان گفت، تخریب میلین و بازسازی ناقص و ناکافی آن یکی از ویژگی های اصلی بیماری MS است. اگرچه در فاز اولیه MS، بازسازی میلین به طور نسبتاً مکرر قابل مشاهده است اما در مراحل بعدی بیماری این فرآیند به طور غیر مؤثری صورت می گیرد.

در حال حاضر شواهد کامل و واضح مبنی بر نقش مشابه مکانیسم هایی میلین سازی نموی¹، در باز سازی میلین² پس از تخریب آن طی بیماری MS، موجود نیست؛ برای مثال بر خلاف میلین سازی نموی، به نظر نمی رسد پیام رسانی Notch، فاکتور تعیین کننده سرعت³ در بازسازی میلین در شرایط آزمایشگاه باشد (Stidworthy, Genoud et al. 2004, Aparicio, Mathieu et al. 2013, Bassil, Orent et al. 2013).

در شکل 1-7 چگونگی نقش miRNA در فرآیند میلین سازی نموی نشان داده شده است.



شکل 1-7- نقش miRNA در فرآیند میلین سازی نموی

با این حال برخی از مکانیسم های دخیل در میلین سازی نموی نقش خود را در بازسازی میلین نیز حفظ کرده اند؛ برای مثال مشخص شده است تنظیم⁴ Lingo-1 در میلین سازی نموی نقش دارد (Stidworthy, Genoud et al. 2004). Lingo-1 در الیگودندروسیت ها بیان می شود و یک تنظیم کننده منفی قوی برای تمایز الیگودندروسیت ها و در نتیجه میلین سازی آکسونی ست؛ حذف Lingo-1 موجب تقویت میلین سازی در مدل های موشی می

¹ Developmental myelination

² Experimental remyelination

³ Rate-determining factor

⁴ Leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing protein

شود در حالی که افزایش بیان آن موجب جلوگیری از تمایز الیگودندروسیت ها و میلین سازی نمودی می شود (Mi, Miller et al. 2005, Andrews and Fernandez-Enright 2015, Zhang, Zhang et al. 2015). به علاوه نقش Lingo-1 در بازسازی میلین در مدل های EAE نیز گزارش شده است (Mi, Miller et al. 2005, Mi, Hu et al. 2007).

در مطالعات دیگری نشان داده شده است که Sox-1, Sox-2, Sox-3 اعضای گروه SoxB1 هستند و هر سه دارای توالی و الگوی بیانی یکسانی می باشند. در این تحقیق مشخص کردند که بیان بالای این ژن ها سبب تولید سلول های نوروئی و در واقع تمایز به سمت نوروئ ها شده که از طرفی مانع تمایز به سمت سلول های الیگودندروسیت می شوند. علاوه بر آن نقش این ژن (Sox-1) در تمایز نوروئی سلول های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells [ESC]) نشان داده شده است؛ به این ترتیب که حین تمایز نوروئی، رونویسی از ژن Sox-1 افزایش می یابد (Archer, Jin et al. 2011, Kim, et al. 2015).

در مطالعه لترز و همکارانش، ژن Bcl2L1 از جمله ژن های اصلی در مسیر تمایز آستروسیتی معرفی شد (Letzen, Liu et al. 2010). در بررسی های این مطالعه مشخص شد که میزان بیان این ژن در روند تمایز آستروسیتی از میزان بیان ژن اصلی در آستروسیت ها، GFAP¹، بیشتر می باشد. بررسی تأثیر مهارکنندگی ژن Bcl2L1 در روند تمایز الیگودندروسیتی در مطالعات آینده بایستی مورد ارزیابی قرار گیرد. در این تحقیق علاوه بر بررسی ژن های آستروسیتی، پروفایلینگ میکروRNAها در روند مسیر تمایز نیز مورد بررسی قرار گرفتند که از بین 866 میکروRNA ارزیابی شده، 183 عدد از آن ها در تمایز الیگودندروسیتی نقش داشتند. اخیراً گزارش شده است miRNA ها در پروسه میلین سازی نمودی نقش دارند. اما اینکه آیا همین نقش را در بازسازی میلین در روند بیماری MS نیز دارند یا خیر، بایستی در مطالعات آینده مشخص شود.

در برخی از مطالعات، در درمان بیماری MS، از سلول درمانی استفاده شده است. این مطالعات مشخص کردند که در 80٪ بیماران که سلول درمانی روی آن ها انجام شده است، تا 4 سال بعد هیچ گونه حمله ای نداشته اند و در 87٪ از این بیماران، ناتوانی های مزمنی ایجاد نشده است. (Multiple Sclerosis Health Center, jan2016) واضح است که موضوع کاربرد miRNA برای اهداف درمانی، نویدبخش آینده بهتری در درمان بیماری MS است اما هنوز مطالعات زیادی نیاز است تا به مرحله استفاده عملی در انسان برسد.

1-8 نقش miR-184 در تمایز سلول های بنیادی عصبی:

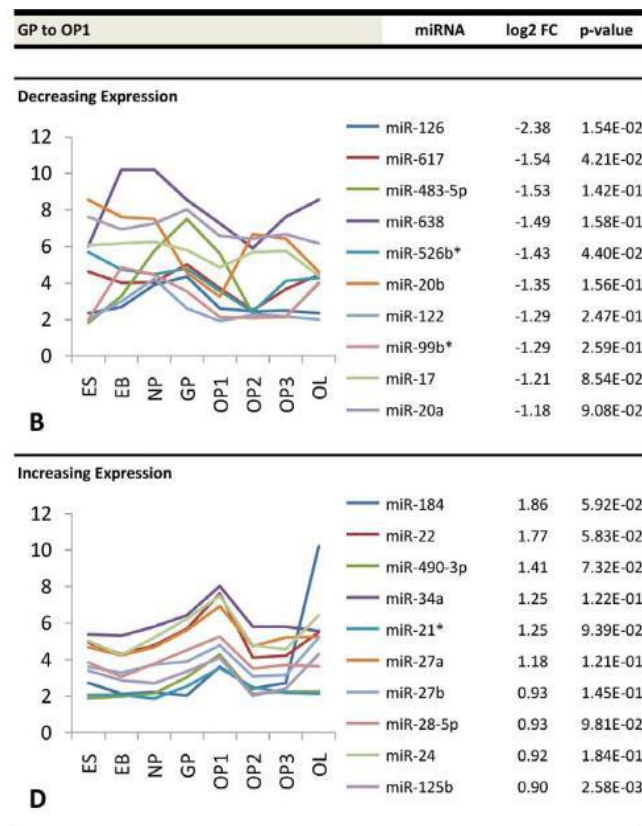
بنا به دلیل کاربردهای درمانی میکروRNAها، می توان با شناسایی اهداف میکروRNAها از آن ها برای جلوگیری در پیشرفت روند بیماری استفاده کرد. برای شناسایی اهداف miRNA نرم افزارهای متعددی به کار گرفته می شوند که یکی از این نرم افزارها، Target scan، می باشد. در این نرم افزار علاوه بر تعیین کردن ژن های هدف miRNA موردنظر، احتمال اتصال miRNA به ژن نیز مشخص

¹ Glial fibrillary acidic protein

می شود و براساس این احتمال می توان به راحتی ژن موردنظر را انتخاب کرد. البته این نرم افزار این امکان را نیز برای کاربر ایجاد می کند که با درنظر داشتن ژن، miRNA هایی که ژن را هدف قرار می دهند، شناسایی کند (Jun 30, 2005, genes.mit.edu). نتایج این مطالعات پیشنهاد می کنند که این مولکول های زیستی نیز به عنوان اهداف درمانی جدیدی می توانند کاربردهای بیشتری در زمینه کنترل و درمان بیماری MS داشته باشند (Deng, Deng et al. 2015). به عنوان مثال ژن های هدف miRNA-184 که میکرو RNA مطالعه شده در این پروژه می باشد، در نرم افزار Target scan بررسی شده اند و در جدول زیر آورده شده است.

جدول 1-2- ژن های هدف miR-184 و سایت های اتصال به این ژن ها را نشان می دهد. در این نرم افزار هر قدر میزان P_{CT} مثبت تر باشد، احتمال اتصال به ژن را بهتر و بیشتر می کند.

نام ژن	سایت حفاظت شده	P _{CT}
PDGFβ	1سایت حفاظت شده 8مری	0.47
Bcl2-like1	1سایت حفاظت شده 8مری	0.46
Sox-1	1سایت حفاظت شده 8مری	0.47
LINGO-1	1سایت حفاظت شده 7مری	0.28



شکل 8-1- پروفایلینگ miRNA ها در مرحله تبدیل پیش ساز گلیالی به پیش ساز الیگودندروسیتی

شکل بالا نشان دهنده میزان بیان میکروRNA های مختلف در مسیر تمایزی الیگودندروسیتی در مرحله تبدیل پیش ساز گلیالی به پیش ساز الیگودندروسیتی می باشد و همانطور که مشاهده می شود miR-184 نیز یکی از این میکروRNA های مؤثر می باشد.

طبق مطالعات انجام شده در مسیر تمایزی الیگودندروسیتی که در بخش 1-7 به آن اشاره شد، ژن های مختلفی در روند این تمایز نقش مهمی را ایفا میکنند. از جمله این ژن ها، LINGO-1 می باشد که سبب مهار تمایز به سمت سلول های الیگودندروسیت می شود. از دیگر ژن های این مسیر می توان به Sox-1 اشاره کرد که طبق مطالعات انجام شده سبب تمایز به سمت سلول های نورونی می شود. هم چنین در مطالعات دیگری مشخص شده است که ژن Bcl2L1 از جمله ژن های اصلی برای تمایز به سمت آستروسیت ها می باشند (Zhang Andrews and Fernandez-Enright, 2015; Mi et al., 2005; Letzen, Liu et al. 2010). علاوه بر این در تحقیقات نشان داده اند که اگر مسیرهای تمایزی نورونی و آستروسیتی مهار شوند، سلول های پیش ساز عصبی به سمت سلول های الیگودندروسیت تمایز می یابند.

در تحقیق لترن و همکارانش، miR-184 به عنوان میکروRNA پیشنهادی برای پیش برد مسیر تمایزی به سمت الیگودندروسیت ها معرفی شده است. در این مطالعه تلاش بر این است که تأثیر miR-184 بر تمایز الیگودندروسیتی سلول های بنیادی پیش ساز سلول های عصبی (Neural progenitor stem cells[NPSCs]) مورد بحث قرار گیرد.

در این پروژه پیش از شروع آزمایش ها، همانطور که ذکر شد مطالعات بیوانفورماتیکی روی میکروRNA موردنظر برای شناسایی ژن های هدف انجام شد. این مطالعه نشان داد که LINGO-1, Sox-1, Bcl2L1 از جمله هدف های اصلی این میکروRNA محسوب می شوند. هدف ما در این پروژه بررسی اثر miR-184 روی تمایز اولیگودندروسیتی سلول های NPSC، تعیین نقش miR-184 در تمایز سلول های OPC، تعیین مسیرهای مولکولی دخیل در تمایز به سمت OPCها و بررسی نقش miR-184 در تمایز اولیگودندروسیتی NPSC ها به منظور سلول درمانی بیماری MS می باشد.

در این مطالعه سلول های مورد نظر به همراه محیط کشت مناسب تکثیر و تمایز پیدا کردند. برای انجام این مطالعه از روش های آنالیز مختلفی استفاده شده است از جمله : QRT-PCR، وسترن بلاتینگ، ایمونوسیتوشیمی (ICC) و مطالعه در موجود زنده (in vivo).

فصل دوم

مروری بر مطالعات گذشته

تا کنون چندین مطالعه با هدف تعیین پروفایل بیان miRNA در بیماران مبتلا به MS انجام شده است. در اکثر این مطالعات پروفایل بیان miRNA در سیستم ایمنی مورد ارزیابی قرار گرفته است و تنها در یک مطالعه پروفایل بیان در پلاک های فعال و غیر فعال بیماران MS سنجیده شده است. به علاوه در برخی مطالعات مقایسه بین فاز عود و بهبودی در بیماران MS-RR نیز صورت گرفته است.

مطالعه صورت گرفته بر روی پروفایل بیانی miRNA در پلاک های مغزی فعال و غیرفعال مبتلایان به MS، تفاوت هایی در الگوی بیان برخی از miRNA ها، در مقایسه با افراد سالم نشان داد (Junker, Krumbholz et al. 2009). به علاوه در مطالعات مختلف الگوی بیان miRNA در خون بیماران مبتلا به MS نیز تعیین شده و پروفایل بیانی متفاوتی در مقایسه با افراد سالم گزارش شده است (Du, Liu et al. 2009, Keller, Leidinger et al. 2009, Otaegui, Baranzini et al. 2009, Cox, Cairns et al. 2010, De Santis, Ferracin et al. 2010, Lindberg, Hoffmann et al. 2010). البته مقایسه نتایج حاصل از این مطالعات، تناقض هایی در الگوی بیانی miRNA نشان می دهد که به نظر می رسد به دلایلی از قبیل ماده اولیه مورد آزمایش (خون تام یا لوکوسیت ها و غیره)، متد اندازه گیری PCR (کمی و یا میکروآرایه ها) و یا پروتوکول های درمانی صورت گرفته بر روی بیماران، باشد. با وجود تناقض ها و مشکلات در تعیین الگوی بیانی miRNA در بیماران MS، همپوشانی بین نتایج مطالعات مختلف، قابل توجه است به طوری که، مشاهده می شود برخی miRNA ها در چندین مطالعه، تغییر بیان یکسانی را نشان داده اند.

نخستین مطالعه بر روی پروفایل بیان miRNA در بیماران MS در سال 2009 توسط Junker و همکاران بر روی پلاک های فعال و غیر فعال MS صورت گرفت. این مطالعه نشان داد miR-326 در پلاک های فعال بیماران نسبت به افراد سالم، تنظیم افزایشی بالایی دارد. همچنین در این مطالعه مشخص شد، miR-497، miR-629 و miR-30a-3p در پلاک های غیر فعال و miR-43a در پلاک های فعال MS، تنظیم افزایشی می یابند (Junker, Krumbholz et al. 2009).

در مطالعه دیگر که توسط Lindberg و همکاران صورت گرفت، تغییرات بیانی miRNA در سلول های (CD8+ CD4+) و نیز سلول های B گرفته شده از خون 23 بیمار MS در مقایسه با افراد سالم مورد بررسی قرار گرفت (Lindberg, Hoffmann et al. 2010). این مطالعه نشان داد، miR-497 در سلول های T(CD4+) و نیز سلول های B، تنظیم افزایشی می یابد در حالی که در سلول های T(CD8+) تنظیم کاهشی نشان می دهد. به علاوه در سلول های T(CD4+)، miR-193a، تنظیم افزایشی و miR-34a تنظیم کاهشی نشان دادند. نهایتاً در سلول های T(CD8+)، miR-629، تنظیم افزایشی و miR-30a-3p تنظیم کاهشی یافتند. جالب است که این miRNA ها در پلاک های MS نیز الگوی بیانی متفاوتی نسبت به افراد سالم نشان داده بودند.

مطالعه دیگر توسط De santis و همکاران بر روی سلول های T تنظیمی (CD4+CD25 high T reg) گرفته شده از 12 بیمار MS و 14 نمونه کنترل سالم- صورت گرفت و الگوی بیانی miRNA 723 با استفاده از آنالیز میکروآرایه ها، مورد بررسی قرار گرفت (De Santis, Ferracin et al. 2010). بیان miRNA 23 در سلول های T reg بیماران MS در مقایسه با افراد سالم، حدوداً 1.5 برابر تغییر یافته بود. در اکثر موارد این miRNA ها تنظیم افزایشی و تعداد کمی نیز تنظیم کاهشی پیدا کرده بودند. مطالعه نشان داد miR-223 در سلول های T reg بیماران MS، تنظیم افزایشی می یابد. به علاوه در این مطالعه مشخص شد miR15a، miR-22 (که پیش از این مشخص شده بود در پلاک های فعال MS تنظیم افزایشی می یابند) و نیز miR-148a (که در پلاک های غیر فعال MS تنظیم افزایشی یافتند) در سلول های T reg بیماران MS، تنظیم افزایشی می یابند.

نهایتاً دو مطالعه دیگر نشان دادند الگوی بیانی miRNA ها در فاز عود (relapse) و فاز بهبودی (remission) بیماری، در افراد مبتلا به RR-MS، متفاوت است (Du, Liu et al. 2009, Otaegui, Baranzini et al. 2009).

بیان ثابت miRNA ها در سرم و پلاسما، آن ها را به بیومارکرهای مهمی در مطالعات تبدیل کرده است. در مطالعه ای که اخیراً انجام شده است، نشان دادند که miR-614, miR-572, miR-1826, miR-648, miR-422a, miR-22 به میزان مشخصی افزایش بیان داشته اند و miR-1979 کاهش بیان شدیدی در بیماری ام اس از خود نشان می دهد (Siegel, Mackenzie et al. 2012).

در مطالعات نشان داده شده که سلول های Th17 به عنوان عامل کلیدی مهم در بروز بیماری های خودایمنی مزمن از جمله ام اس می باشد. تنظیم تمایز این سلول ها برای تشخیص و درمان این بیماری ها ضروری می باشد. در این مطالعه نشان داده شد که miR-30a که کاهش بیان شدیدی در طول تمایز سلول های Th17 و بروز بیماری های دمیلینه کننده از خود نشان می دهد، در سلول های بکر T با افزایش بیان مانع از تمایز این سلول ها به سمت سلول های Th17 شده و نیز در سلول های Th17 بیان چندانی ندارند. از طرفی مشخص شد که هدف اصلی miR-30a رسپتور اینترلوکین 21 (IL-21R) می باشد که افزایش بیان این اینترلوکین با مهار miR-30a سبب تمایز به سمت سلول های Th17 می شود. بنابراین می توان نتیجه گرفت که miR-30a با هدف قرار دادن IL-21R سبب مهار تمایز سلول های Th17 و بیماری زایی ام اس می شود (Qu, Zhou et al. 2016).

در مطالعه دیگری نشان داده شد که miR-29c-3p, miR-29a-3p به صورت متفاوتی به درمان با IFN- β پاسخ می دهند. بیان miR-29c-3p, miR-532-5p به طور مشخصی در نمونه هایی که در مرحله پیش از درمان هستند با نمونه های درمان شده کاملاً متفاوت است و این خود نشان دهنده تأثیر درمان در این روش می باشد (Hecker, Thamilarasan et al. 2013).

در مطالعه ای که به تازگی بر روی بیماران مبتلا به MS انجام شده است، افزایش بیان آنزیم های دخیل در تولید زیستی میکرو RNA ها شامل Dicer, Drosha و DGCR8 را گزارش نموده اند، که

این گزارش هم تأییدی بر نقش میکرو RNA ها در بیماری زایی بیماری MS می باشد (Jafari, Shaghghi et al. 2015).

در برخی از مطالعات برای انجام تمایز از داروهای ویژه ای استفاده می کنند. برای مثال ماکی و همکارانش از داروی آدرنومدولین (AM) به عنوان یک فاکتور تقویت کننده تمایز استفاده کردند. در این تحقیق، تمایز سلول های OPC تحت شرایط هیپواکسی، با تیمار کلسیم کلرید، مهار شد؛ در حالی که در همین شرایط داروی AM این تمایز را تقویت می کند. بنابراین از این دارو می توان به عنوان داروی تقویتی مسیر تمایزی الیگودندروسیتی نام برد (Maki, Takahashi et al. 2015). در کنار این قبیل داروهای احیاشده، می توان به فاکتورهای دیگری نظیر میکروRNAها برای پیش برد و تحریک مسیر تمایزی اشاره کرد. علاوه بر نقش miRNAها در بیماری زایی ام اس، نقش آن ها در بهبود این بیماری نیز به اثبات رسیده است.

میکروRNAها به عنوان تنظیم کننده های مسیر تمایزی و تعیین سرنوشت یک سلول عمل می کنند. در تحقیقات متعددی نحوه تأثیر این تنظیم کننده ها روی سلول های Neuroepithelial-like stem cells (NES) بررسی شده است. محققین نشان دادند که miR-153 و miR-181a در تمایز نوروئی این سلول ها نقش مهمی را ایفا می کنند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که این میکروRNAها به همان اندازه که در بروز بیماری نقش دارند می توانند در درمان و بهبود بیماری نیز نقش داشته باشند. علاوه بر آن این فرضیه نیز به وجود می آید که میکروRNAهای مؤثر در روند تمایزی الیگودندروسیتی مورد بررسی قرار گیرند (Stappert, Borghese et al. 2013).

مطالعات نشان می دهند حذف آنزیم Dicer در رده های سلولی الیگودندروسیت موشی موجب اختلال اساسی در میلین سازی نموی می شود؛ این مطالعات نشان می دهند miRNAها در ساخت میلین نموی نقش اساسی دارند (Shin, Shin et al. 2009, Dugas, Cuellar et al. 2010, Zhao, He et al. 2010). به علاوه در این مطالعات نشان داده شد miR-219 و miR-338 به طور مثبتی در فرآیند میلین سازی نقش دارند به گونه ای که حذف این دو miRNA موجب مهار میلین سازی می شود. از طرف دیگر این مطالعات نشان دادند حذف این دو miRNA موجب افزایش تعداد سلول های پیش ساز الیگودندروسیت (OPCs) که گیرنده های PDGF را بیان می کنند، می شود. در این مطالعه نشان دادند که تأثیر این میکروRNAها نسبت به فاکتورهای تمایزی اضافه شده به محیط، بیشتر می باشد. این مطالعه نشان داد که مدت زمان مسیر تمایزی و میزان تمایز به سمت سلول های الیگودندروسیتی با ترانسداکت این سلول ها بهبود بیشتری می یابد (Zhao et al., 2010).

مطالعه ای که اخیراً صورت گرفت پیشنهاد می کند miR-219 و miR-338 احتمالاً به عنوان ترمزهایی (Brakes) عمل می کنند که موجب به تعویق انداختن تکثیر سلول های پیش ساز الیگودندروسیت و به این ترتیب به راه افتادن میلین سازی می شوند (Nave 2010, Zhao, He et al. 2010).

شواهد نشان می دهند، بیان آنزیم Dicer در طول تمایز الیگودندروسیت ها افزایش می یابد (Cahoy, Emery et al. 2008).

تحقیقات دیگری نشان داده اند که در بیماری MS تخریب میلین سبب عملکرد نادرست آکسون ها و نهایتاً از بین رفتن آکسون می شود. در مراحل اولیه این بیماری تمایز از سلول های OPC به الیگودندروسیت ها صورت می گیرد ولی با گذشت زمان مراحل تمایز و ترمیم نیز به درستی انجام نمی شوند. از این رو، امروزه برای درمان بیماری ام اس، تحقیقات به پیش برد روند تمایز OPC ها به سمت الیگودندروسیت ها روی آورده اند. در یکی از تحقیقات انجام شده، پژوهشگران تأثیر مسیر Rho-A/Rho-associated kinase (ROCK) و استفاده از یک مهارکننده انتخابی این مسیر را در روند تمایز از سلول های OPC به سلول های الیگودندروسیت مورد ارزیابی قرار دادند. مهار این مسیر سیگنالینگ به عنوان یک القاکننده مسیر تمایز الیگودندروسیتی، تمایز سلول های OPC و نیز تولید سریع تر میلین می باشد (Pedraza, Taylor et al. 2014).

در کنار بررسی پروفایلینگ میکروRNA ها در بیماری زایی MS، پروفایلینگ آن ها در روند تمایز سلولی نیز ارزیابی شد. در این بررسی ها نشان داده شد که همانند بروز بیماری، در تمایز سلول های عصبی نیز پروفایلینگ متفاوتی وجود دارد و این دانش می تواند کمک بزرگی در پیش رفت روند تمایز سلولی در سلول درمانی به ما کند. برای مثال در این مطالعات نشان داده شد که miR-367 در مراحل سلولی میانی و نهایی OPC به میزان بالایی بیان می شود، در حالی که در مرحله الیگودندروسیتی این میکروRNA بیان پایینی دارد.

هم چنین این مطالعات مشخص کردند که miR-181a و miR-181b در آخرین مرحله تمایز یعنی مرحله الیگودندروسیتی بیان بالایی دارند و بر خلاف miR-367 بیان پایینی در مرحله میانی و نهایی OPC دارند.

میانگین آنالیز RT-PCR برای miR-184 افزایش 6.8 برابری را در مرحله پیش ساز سلول های گلیال (Glial progenitor) و مرحله اولیه سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی را نشان داد (۰). این بررسی ها نشان دهنده نقش مهم این میکروRNA در تمایز الیگودندروسیتی می باشد.

در مطالعه لترز و همکارانش که به منظور تمایز از سلول های بنیادی جنینی به سلول های الیگودندروسیتی بود، مراحل مختلف این مسیر تمایز نشان داده شد. در یکی از این مراحل پس از تولید سلول های پیش ساز عصبی، سلول های پیش ساز گلیالی تولید می شوند که میزان بیان فاکتورهایی نظیر NG2، PDGFR α و Olig1 در آن ها افزایش می یابد. قابل ذکر است که این سلول ها، سلول های دوقطبی هستند و بسته به اینکه چه فاکتور رشدی به محیط آن ها افزوده شود، قابلیت تبدیل و تمایز به سلول های مختلف را دارند (Letzen, Liu et al. 2010).

به طور کل، تمایز سلول های الیگودندروسیتی از سلول های ESC برای اولین بار در سال 2005 توسط نیستور انجام شد (Nistor et al. 2005) و از آن به بعد مقاله های زیادی روی نحوه این تمایز کار شد. با این وجود بررسی روند تمایز از سلول های induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) که به

عنوان یک منبع سلولی احتمالی برای الیگودندروسیت ها محسوب می شوند، به تازگی در حال انجام است (Czepiel et al. 2011; Tsuji et al. 2010; Poya et al. 2011; Wang et al. 2013).

اخیراً کمپانی های بیوتکنولوژی سلول های الیگودندروسیتی با منبع انسانی را در اختیار پژوهشگران می گذارند تا تحقیقات بیشتری روی مسیرهای تمایزی و فازهای کلینیکی و غیره انجام شود. به همان میزانی که غربالگری داروهای احیاکننده مهم می باشد؛ بایستی مؤثر بودن تمایز سلول های الیگودندروسیتی نیز ارزیابی شود. به عنوان مثال اگر سلول های OPC منبع تولیدی سلول های الیگودندروسیتی معرفی شده اند باید تمامی مراحل تمایز، نحوه نگهداری و نیز منشأ سلول ها طبق قواعد و قوانین ذکر شده در (US Food and Drug Administration (FDA)، good manufactory practice (GMP) و European medicines agency (EMA) مورد ارزیابی قرار گیرند.

در مطالعه دیگری روی تأثیر miRNAها در بهبود بیماری ام اس، مارگارتا و همکارانش نشان دادند که میکروRNAها با اتصال به هدف های خود سبب بهبود بیماری می شوند. در این مطالعه با بررسی های انجام شده توسط برنامه نرم افزاری Target scan مشخص کردند که miRNAها به ژن های بیان کننده T-cellها متصل می شوند و بنابراین سبب جلوگیری از پیشرفت روند بیماری می شوند (Jernås, Malmeström et al. 2013).

در مطالعات سلول درمانی، سلول های NPC از سلول های ESC تمایز می یابند و این سلول های تمایز یافته به داخل مغز منتقل می شوند. در مغز با توجه به شرایط محیطی موجود این سلول ها می توانند به سه دسته اصلی سلول های عصبی یعنی نورون ها، آستروسیت ها و الیگودندروسیت ها تمایز یابند. بنابراین با تغییر شرایط محیطی سیستم عصبی مرکزی از جمله کاهش و یا افزایش بیان میکروRNAهای خاص و یا فاکتورهای رشد می توان مسیر تمایزی سلول ها را به سمت موردنظر سوق داد و سبب بهبود بیماری شد (Reubinoff, Itsykson et al. 2001, Dhara and Stice 2008).

مطالعه ای در سال 2010 مشخص کرده است که تعداد سلول های الیگودندروسیتی به عوامل مختلفی بستگی دارد. یکی از این عوامل میکروRNAها می باشند. پروفایلینگ میکروRNAها در این تحقیق، نشان داد که گروه miR-17-92 در سلول های الیگودندروسیتی به میزان بالایی بیان می شوند. حذف این گروه در مدل موشی سبب کاهش تعداد سلول های الیگودندروسیتی شد و در حالت محیط کشت نیز نشان داده شد که سلول های OPC برای تمایز الیگودندروسیتی به بیان این گروه میکروRNAی نیازمندند. چگونگی تأثیر این میکروRNA در تمایز سلول ها مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که miR-19b با فعالسازی مسیر سیگنالینگ Akt، Pten را در سلول های OPC غیر فعال کرده و در نهایت سبب تکثیر سلولی می شود (Budde, Schmitt et al. 2010).

یکی از مطالعاتی که روی miR-214 به انجام رسیده است، بیان بالای این میکروRNA را در سلول های OPC نشان می دهد؛ در حالی که در الیگودندروسیت ها این miRNA بیانی از خود نشان نمی دهد. این مشاهدات پیشنهاد می کنند که miR-214 به فاکتور¹ Mobp، که تحریک تولید میلین

¹ Myelin-associated oligodendrocyte basic protein

را سبب می شود، اتصال پیدا می کند و بنابراین این میکروRNA به عنوان فاکتور مهاری تولید میلین معرفی می شود (Letzen, Liu et al. 2010).

از دیگر فاکتورهای مهاری مسیر تمایزی الیگودندروسیتی، miR-199a-5p می باشد. این میکروRNA به فاکتور¹ C11orf9 متصل می شود و در نتیجه سبب کاهش بیان این فاکتور می شود. C11orf9 همولوگ MRF موشی می باشد که برای بلوغ الیگودندروسیت ها و تولید میلین ضروری می باشد. در نتیجه با مهار این فاکتور، تمایز نیز مهار می شود (Emery, Agalliu et al. 2009).

در مطالعاتی که اخیراً به انجام رسیده است، miR-297c-5p مورد بررسی قرار گرفته است. تست لوسیفراز این بررسی ها مشخص کرد که این میکروRNA، سیکلین T2 (CCNT2)، زیرواحد تنظیمی از بخش رونویسی فاکتور b، را که خود مهارکننده مسیر تمایز الیگودندروسیتی است، مورد هدف قرار می دهد. هم چنین CCNT2 مانع از تمایز سلول های OPC شده؛ در حالی که در روند تکثیری آن ها تأثیری ندارد. بنابراین در این مطالعه، دو نقش هم زمان miR-297c-5p با تأثیر بر روی CCNT2، هم به عنوان تنظیم کننده مهاری تکثیر سلول های OPC و هم با عنوان تنظیم کننده مثبت تمایز به سمت سلول های الیگودندروسیت مورد ارزیابی قرار گرفت (Kuypers, Bankston et al. 2016).

miR-23a به عنوان فاکتور القایی دیگری در مسیر تمایزی الیگودندروسیتی شناسایی شده است. این میکروRNA با اتصال به لامین B1 که سبب دمیلینه شدن سلول های سیستم عصبی مرکزی می شود، تمایز به سمت الیگودندروسیت ها و نیز سنتز میلین را افزایش می دهد (Lin, Huang et al. 2013).

بررسی اثر miR-184 روی تمایز اولیگودندروسیتی سلول های NPSC، تعیین نقش miR-184 در تمایز سلول های OPC و تعیین مسیرهای مولکولی دخیل در تمایز به سمت OPC ها از اهداف این پروژه می باشد.

¹ Chromosome 11 open reading frame 9

فصل سوم

مواد و روش ها

3-1 مواد مورد استفاده

3-1-1 آنزیم ها

3-1-1-1 Real-time PCR و RT-PCR .PCR برای انجام

تمامی آنزیم های مورد استفاده برای این آزمایش ها در این مطالعه از شرکت آلمانی Fermentas خریداری و مصرف شدند.

آنزیم Taq DNA polymerase ، آنزیم RevertAcidM-MuLV Reverse Transcriptase .Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X

3-1-1-2 برای کلون کردن ژن های Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1, anti-miR-184 و تأیید

ورود آن در وکتور

آنزیم NotI

آنزیم XhoI

آنزیم T4 DNA Ligase, 5U/ μl

تمامی این آنزیم ها نیز از شرکت Fermentas خریداری شدند.

3-2-1 محیط های کشت

3-2-1-1 محیط کشت و ذخیره سازی باکتری

پودر های LB Broth و Agar از شرکت SIGMA خریداری شده اند.

محیط کشت LB حاوی تریپتون و عصاره مخمر است. تریپتون حاوی اسید آمینه و پپتیدهای کوچک است و همچنین عصاره مخمر تامین کننده نیازهای نیتروژنی همراه با قند و مواد آلی و معدنی می باشد.

3-2-1-2 محیط کشت سلولی

محیط کشت DMEM¹ برای کشت سلول های HEK 293T که در این مطالعه استفاده شدند همراه با FBS به کار برده می شود.

3-3-1 آنتی بیوتیک ها

آنتی بیوتیک آمپی سیلین و کانامایسین (داروسازی دانا، تبریز، ایران) برای انتخاب، تکثیر و تخلیص پلاسمید از سلول باکتریایی

آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین (داروسازی دانا، تبریز، ایران) برای تهیه محیط کشت های سلولی

3-4-1 کیت ها

کیت تخلیص پلاسمید (RBC Bioscience, Korea)High-Yield Plasmid Extraction

¹ Dulbecco's Modified Eagle's Medium

3-1-5- سلول ها

3-1-5-1- سلول های پروکاریوتی

سویه DH5 α از باکتری *E. coli* (این باکتری ها از بانک مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته تهیه شدند).

3-1-5-2- سلول های یوکاریوتی

سلول های یوکاریوتی HEK 293T (از بانک سلولی مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته تهیه شدند).
سلول های یوکاریوتی NPSC (از بانک سلولی رویان خریداری شدند).

3-1-6- سایر مواد

نمک های فسفات سدیم، کلرید سدیم، کلرید منیزیم، تریس، EDTA، استات سدیم، اتانول، متانول، ایزوپروپانول، dNTP، آگارز، انواع پودرهای محیط کشت باکتری، اتیدیوم برماید، FBS، RNX-Plus، بافر PBS، گلیسرول 60٪ و ...

3-1-7- وسایل یک بار مصرف

فلاسک کشت سلولی (T25, T75)، پلیت کشت سلولی (6 well، 24 well، 48 well، 96well)، پلیت 10 سانتی متری، میکروتیوب (0.2 ml، 0.5 ml، 1.5 ml)، فالكون (15 ml، 50 ml)، پیپت پاستور، پیپت مدرج (1 ml، 2 ml، 5 ml)، کاغذ صافی، فیلتر 0.2mm مخصوص فیلتراسیون، سر سمپلر (زرد، آبی، کریستالی) و ...

3-1-8- دستگاه ها

دستگاه سانتریفوژ (دور بالا و معمولی)، انکوباتور، اتوکلاو، ترموسایکلر End point PCR و Real-Time PCR، دستگاه بیوفتومتر، هود لامینار، میکروسکوپ معمولی و معکوس و فلوئورسنت، یخچال، فریزر معمولی و 70- درجه، تانک ازت، دستگاه الکتروفورز، لامپ UV، هات پلیت، ترازوی حساس، بن ماری 37 درجه سانتی گراد، دستگاه Gel-Doc و ...

3-1-9- وکتورهای مورد استفاده

pLENTI III-eGFP- miR-184 (Stem Cell Technology Research Center, Iran)
psPAX (Addgene, Cambridge, Massachusetts, USA)
pMD2.G(Addgene, Cambridge, Massachusetts, USA)

3-2- دستورالعمل های عمومی

3-1-2- طرز تهیه ی محلول ها و بافر ها

3-1-1-2- بافر الکتروفورز تریس - اسید استیک (TAE 50X)

بافر استفاده شده برای الکتروفورز در این پروژه بافر تریس - اسید استیک می باشد برای تهیه این بافر مقدار 242 گرم تریس در 57/1 میلی لیتر اسید استیک و 100 میلی لیتر EDTA 0/5 میلی مولار حل شد و pH آن به 8 رسید.

3-2-1-2- محلول کلسیم کلرید CaCl_2

برای تهیه محلول کلسیم کلرید 0/73 گرم از پودر کلسیم کلرید در 50 میلی لیتر آب مقطر حل شد و پس از اتوکلاو در دمای 4°C نگهداری شد.

3-2-2- طرز تهیهی آنتی بیوتیک ها

3-2-2-1- آنتی بیوتیک آمپی سیلین

استوک این آنتی بیوتیک با غلظت 100 mg/ml تهیه شد. غلظت نهایی این آنتی بیوتیک در محیط کشت 100 $\mu\text{g/ml}$ است.

3-2-2-2- آنتی بیوتیک کانامایسین

استوک این آنتی بیوتیک با غلظت 50 mg/ml تهیه شد. غلظت نهایی این آنتی بیوتیک در محیط کشت 100 $\mu\text{g/ml}$ است.

3-3 روش کار

3-3-1- کشت باکتری

در این پروژه برای انجام کارهای کلونینگ و زیاد کردن وکتورهای مورد استفاده از باکتری *E. coli* که یک باکتری گرم منفی از خانواده *Enterobacteriaceae* می باشد، استفاده شد. برای اطمینان از حفظ شدن پلاسمید در باکتری لازم است پلاسمید مورد نظر دارای ژنی باشد که بدون حضور آن، باکتری توانایی رشد و بقا در محیط تمایز مناسب نداشته باشد. وجود چنین ژن هایی به عنوان نشانگرهای انتخابی در فرایند کلونینگ ضروری است تا از این طریق کلون های حاوی وکتور مورد نظر فقط انتخاب شوند. تمامی وکتور های به کار رفته در این مطالعه، به جز وکتور pLentiIII-miR-184، حاوی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین می باشند که با غلظت 100 میکروگرم بر میلی لیتر به محیط کشت اضافه می شدند و برای حفظ پلاسمید pLentiIII-miR-184 آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت 100 میکروگرم بر میلی لیتر به محیط کشت باکتری اضافه می کنیم.

3-3-1-1- کشت مایع *E. coli*

کشت مایع *E. coli* عموماً در محیط برات مایع (LB)¹ دارای آنتی بیوتیک در دمای بهینه 37 درجه سانتی گراد همراه با گردش بین 100 تا 120 دور در دقیقه انجام می گیرد. برای تلقیح از کشت جامد به کشت مایع در کنار شعله و در شرایط سترون از لوپ پلاتینی بهره گرفته می شود. محیط LB به صورت حل کردن 2.5 گرم از پودر آن به ازای 50 میلی لیتر آب تهیه شده و سپس در دستگاه اتوکلاو برای استریل شدن قرار می گیرد. این محیط می تواند در دمای آزمایشگاه قرار گیرد و برای استفاده های طولانی مدت بهتر است در دمای 4 درجه نگهداری شود.

¹ Liquid broth

3-1-2-3- E. coli کشت جامد

برای کشت جامد *E. coli* از پلیت های استریل یک بار مصرف و محیط LB حاوی آگار دارای آنتی بیوتیک استفاده می شود. برای تهیه این محیط به محیط LB قبل از انجام اتوکلاو به میزان 1.5 گرم از پودر آگار به ازای هر 50 میلی لیتر از محیط LB افزوده شده و محلول حاصل در اتوکلاو قرار می گیرد. برای انتقال باکتری از محیط مایع به محیط جامد ابتدا مقدار مناسب از محیط مایع در وسط پلیت ریخته شده و سپس با کمک پیپت پاستور سرکج بر روی سطح مورد نظر پخش می شود.

2-3-3- واکنش زنجیره ای پلی مرز

واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) فرآیندی سریع و ساده برای تکثیر قطعه ای از DNA در شرایط *in vitro* می باشد و با استفاده از اجزای همانند سازی طبیعی DNA در داخل لوله آزمایش DNA را تکثیر می نماید.

برای انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز به مولکول DNA یا RNA به عنوان الگوی واکنش، یک جفت آغازگر¹، آب مقطر (آب به صورت مؤکد باید عاری از هرگونه آلودگی DNA ای باشد)، مخلوط dNTP از هر چهار نوع نوکلئوتید (A, C, T, G)، آنزیم پلی مرز taq و بافر مربوط به واکنش نیاز می باشد. بافر این واکنش pH و غلظت نمکی مناسب برای فعالیت آنزیم را فراهم می کند. اجزای مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR همراه با مقادیر و غلظت هر کدام در جدول 1-3 مشاهده می شوند. همچنین در جدول 2-3 برنامه سیکل های زمانی واکنش PCR در یک PCR معمولی (غیر از کلونی PCR) دیده می شود.

جدول 1-3- مواد مصرفی و مقادیر آنها در واکنش PCR

جز تشکیل دهنده	حجم (μl)
Forward Primer (10pM)	0.5
Reverse Primer (10pM)	0.5
Buffer(10X)	2.5
Taq Polymerase	0.25
Template	2
dNTP(02mM)	1
MgCl ₂ (2mM)	1
H ₂ O	12.25
Total volume	20

جدول 2-3- برنامه سیکل های زمانی واکنش PCR

مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل
Enzyme activation	95° C	5 دقیقه	1
Denaturation	95° C	30 ثانیه	35
Annealing	60° C	30 ثانیه	
Extention	72° C	30 ثانیه	
Final Extention	72° C	7 دقیقه	1

¹ Primer

3-3-4 کلون کردن ژن Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 در وکتور psi-checkII

کلون کردن قطعه حاوی ژن Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 در ناحیه پس از پروموتور T7 در وکتور psi-checkII انجام شد. این کار با استفاده از آنزیم های NotI/XhoI انجام شد. کشت باکتری حاوی وکتور psi-checkII در محیط مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (مقاومت آنتی بیوتیکی وکتور) انجام شد. پس از 16 ساعت رشد باکتری تخلیص پلاسمید به وسیله کیت تخلیص پلاسمید (روش کیت) در قسمت تخلیص پلاسمید از باکتری ترانسفرم شده عنوان می شود. صورت گرفت. ابتدا غلظت پلاسمید های استخراج شده با دستگاه بیوفتومتر بررسی شده و سپس بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید تا از کیفیت تخلیص هم اطمینان حاصل شود. در مرحله بعد از روی DNA ژنومیک با استفاده از پرایمرهای ذکر شده در جدول ذیل قطعه ژن Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 با تکنیک PCR تکثیر شد. این پرایمرها به گونه ای هستند که در سر 5' پرایمر فوروارد جایگاه برش برای آنزیم XhoI قرار داده شده و در سر 3' پرایمر ریورس جایگاه برش برای آنزیم NotI قرار داده شده است.

جدول 3-3 توالی پرایمرهای به کار گرفته شده جهت کلونینگ لوسیفراز

نام پرایمر	توالی پرایمر	دما (Tm)
H-BCL2L1-F	CGC TCG AGG GAA CTC TAT GGG AAC AAT GC	53
H-BCL2L1-R	AAG CGG CCG CTC TAG CCA GTC CAG AGG TGA G	56.4
H-Sox1-F	GCG CTC GAG AGG CAG GTC CAA GCA CTT AC	63.4
H-Sox1-R	AAG CGG CCG CCT AAG TCG TAG TGG TGC TCA GC	63.4
H-Lingo1-F	GCG CTC GAG CGA CAT CAA GAC CCT CAT CAT	57.3
H-Lingo1-R	AAG CGG CCG CTC TCT CCA CTG ACT GTG CTG TC	55.2

پس از این کار محصول PCR به وسیله آنزیم های NotI و XhoI هضم آنزیمی شد. از طرف دیگر وکتور psi-checkII تخلیص شده نیز با این آنزیم ها برش داده شد، با توجه به نقشه این وکتور که در شکل 3-1 مشاهده می شود این آنزیم ها ناحیه بعد از پروموتور T7 را برش می دهند. پروتکلی که برای هضم آنزیمی قطعات PCR شده و وکتور psi-checkII استفاده گردید در جدول زیر دیده می شود.

اتصال آنزیمی با استفاده از آنزیم T4 لیگاز انجام گرفت. برای انجام این واکنش تیوب حاوی واکنش دهنده ها به صورت overnight در دمای 22 درجه سانتی گراد قرار داده شد. نسبت های ذکر شده در جدول 3-4 برای واکنش استفاده شدند.

جدول 3-4- مواد استفاده شده و مقادیر آن ها در واکنش اتصال

جز واکنش	حجم (μl)
محصول PCR هضم شده	8
Plasmid psi-checkII هضم شده	2
10X Ligation buffer	2
T4 DNA Ligase	2
H ₂ O	6
Total volume	20

روز بعد باکتری DH5α (که بسیاری از وکتورهای که به صورت طبیعی در باکتری ها وجود دارند از این سویه حذف شده اند.) با روش کلرید کلسیم (توضیح داده شده در قسمت مستعد نمودن باکتری با روش شیمیایی (کلسیم کلرید) و ترانسفورماسیون) مستعد گردید و با محصول اتصال psi-checkII/Bcl2L1, psi-checkII/LINGO-1, psi-checkII/Sox-1 ترانسفورم شد. مقاومت آنتی بیوتیکی این وکتور آمپی سیلین می باشد که در محیط جامد LB حاوی این آنتی بیوتیک ها، کشت باکتری ترانسفورم شده انجام شد.

3-3-5 مستعد نمودن باکتری با روش شیمیایی (کلسیم کلرید) و ترانسفورماسیون

برای انجام واکنش ترانسفورماسیون (وارد کردن وکتور در باکتری)، از باکتری *E. coli* سویه DH5α استفاده شد و قطعات واکنش اتصال Bcl2L1 به وکتور در این باکتری به روش شیمیایی ترانسفورم شد. شرایط تهیه سلول مستعد به شرح زیر است:

1- از باکتری *E. coli* سویه DH5α (استوک موجود در 70- درجه سانتی گراد) کشت اولیه در محیط LB Broth داده، یک شب با حرکت 250 دور در دقیقه، در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شد.

2- روز بعد از آن تلقیح مجدد در لوله حاوی 10 میلی لیتر LB broth شد و در انکوباتور شیکردار به مدت 3-4 ساعت انکوبه شد تا زمانی که کدورت به دانسیته نوری حدود 0/4-0/5 برسد که با دستگاه بیوفتومتر بررسی شد.

3- باکتری در سانتریفوژ یخچال دار 9000rpm به مدت 10 دقیقه در 4درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید.

4- محیط رویی خارج شده و رسوب بر روی یخ در 1 میلی لیتر 0.1 M CaCl₂ (کلسیم کلرید) سرد به آرامی سوسپانسیون شدند.

5- روی یخ به مدت 20-30 دقیقه قرار داده شد.

6- سلول ها با سانتریفوژ 9000 rpm به مدت 3 دقیقه در 4 درجه سانتی گراد رسوب داده شدند.

- 7- سوسپانسیون مجدد رسوب باکتری ها در 700 میکرولیتر 0.1 M CaCl₂ سرد و روی یخ به مدت 20-30 دقیقه قرار داده شدند.
- 8- سلول ها با سانتریفوژ در 9000 rpm به مدت 3 دقیقه در 4 درجه سانتی گراد رسوب داده می شوند.
- 9- سوسپانسیون مجدد رسوب باکتری ها در 300 میکرولیتر CaCl₂ سرد و روی یخ به مدت 20-30 دقیقه قرار داده می شوند.
- در مرحله بعد مرحله ترانسفورماسیون سلول ها با وکتور به شرح زیر انجام شد:
- 1- تقسیم 300 میکرولیتر از باکتری مستعد شده در دو لوله میکروتیوب هریک حاوی 150 میکرولیتر سوسپانسیون باکتری مستعد روی یخ قرار دارند.
 - 2- 200 نانوگرم از محصول اتصال به یکی از تیوب های سوسپانسیون باکتری اضافه می کنیم (لوله دیگر به عنوان کنترل منفی نگهداری شد).
 - 3- روی یخ به مدت 30 دقیقه قرار داده شدند.
 - 4- تیوب در دمای 42 درجه سانتی گراد به مدت 90 ثانیه قرار داده شدند.
 - 5- به سرعت به روی یخ به مدت 2 دقیقه انتقال می دهیم.
 - 6- 1 میلی لیتر محیط LB Broth فاقد آنتی بیوتیک به هر یک از لوله ها اضافه می کنیم و انکوباسیون در انکوباتور شیکردار در 37 درجه به مدت 1 ساعت قرار می دهیم.
 - 7- 100 میکرولیتر از سوسپانسیون به محیط LB Agar (پلیت) حاوی آنتی بیوتیک مناسب با فاکتور مقاومت وکتور انتقال می دهیم.
 - 8- باقی مانده سوسپانسیون در 9000 rpm به مدت 3 دقیقه سانتریفوژ می کنیم.
 - 9- سوسپانسیون مجدد رسوب در 100 میکرولیتر محیط مایع و در پلیت مشابه کشت می دهیم. لوله کنترل منفی نیز روی یک پلیت کشت داده شد و در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد به مدت 16-18 ساعت کشت شد.

روز بعد پلیت ها از لحاظ وجود کلونی باکتری بررسی شدند که پلیت مربوط به کنترل منفی عاری از هر نوع کلونی باکتری و تأیید کننده دقت کار و عدم آلودگی بود.

3-3-6- انجام واکنش کلونی PCR برای تأیید ورود وکتور حاوی قطعات Bcl2L1,

LINGO-1, Sox-1 به باکتری

واکنش PCR بر روی هر یک از کلونی های رشد کرده بر روی محیط جامد LB (آنتی بیوتیک دار) به منظور تأیید ورود قطعات به وکتور در باکتری *E. coli* همانند روش ذکر شده در قسمت واکنش زنجیره ای پلی مرز انجام گرفت. تنها نکته ای که در این جا حائز اهمیت می باشد انجام PCR برای 25 سیکل می باشد تا از این طریق از ایجاد نتایج مثبت نادرست در اثر وجود آلودگی جلوگیری شود. جدول 3-5 سیکل های زمانی واکنش کلونی PCR را نشان می دهد.

جدول 3-5- برنامه سیکل های زمانی برای کلونی PCR

مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل
Enzyme activation	95° C	5 دقیقه	1
Denaturation	95° C	25 ثانیه	30
	60° C	25 ثانیه	
	72° C	25 ثانیه	
Extention	72° C	10 دقیقه	1
Final Extention	72° C	10 دقیقه	1

جدول 3-6- توالی پرایمرهای به کار گرفته شده جهت کلونینگ

نام پرایمر	توالی پرایمر	دما (Tm)
CP-seq-psi-F	GAG GAC GCT CCA GAT GAA ATG	61
CP-seq-psi-R	CTC ACA CAA AAA ACC AAC ACA CAG	62

کلونی هایی که باند مورد نظر (در این جا با توجه به پرایمرهای به کار گرفته شده باند مربوط به Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 بوده و به ترتیب طولی حدود 600, 900, 1600 جفت باز دارد). در آن ها دیده شد به عنوان کلونی هایی که قطعه در آن ها کلون شده، انتخاب شدند و از روی پلیت پشتیبان در محیط مایع LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین جهت انجام استخراج پلاسمید و تأیید نهایی کشت داده شدند.

3-3-7 تخلیص پلاسمید از باکتری ترانسفرم شده

تخلیص پلاسمید به منظور تأیید قطعات ترانسفرم شده در باکتری با کیت استخراج پلاسمید انجام شد. این سیستم بر اساس لیز قلیایی باکتری و اتصال پلاسمید به غشاء سیلیکاژل استوار است. دستور العمل تخلیص پلاسمید به شرح زیر است :

1. کشت شبانه باکتری به حجم 10 میلی لیتر در 3500 rpm به مدت 9 دقیقه سانتیفریوژن شد.
2. پس از خارج نمودن محیط کشت بصورت کامل، رسوب باکتری ها در 200 میکرولیتر محلول سوسپانسیون مجدد حل شده و به یک میکروتیوپ منتقل شد.
3. 200 میکرولیتر محلول لیزکننده به میکروتیوپ اضافه شده و 5-10 بار به آرامی بر گردانده شد تا به خوبی مخلوط شود.
4. میکروتیوپ به مدت حداکثر 5 دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.
5. 400 میکرولیتر محلول خنثی کننده به میکروتیوپ افزوده شده و 5-10 بار به آرامی بر گردانده شد تا به خوبی مخلوط شود.
6. در 9000 rpm و دمای 25 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه سانتیفریوژن شد.
7. مایع رویی به آرامی به ستون تخلیص پلاسمید منتقل شده، سپس در 13000 rpm به مدت 60 ثانیه سانتیفریوژن شده و مایع خارج شده دور ریخته شد.
7. به ستون 700 میکرولیتر بافر شست و شو اضافه شده مانند مرحله قبل سانتیفریوژن انجام شد.
8. ستون به مدت 1 دقیقه جهت خارج شدن کامل بافر سانتیفریوژن شد.

مقدار 50 میکرولیتر بافر EB به ستون اضافه شده و به مدت 1 دقیقه در 13000 rpm سانتریفوژ شد. پلاسمید تخلیص شده در مایع خارج شده قرار داشت.

3-3-8- آشکار سازی محصولات استخراج شده (پلاسمید) با الکتروفورز روی ژل آگارز

ژل آگارز را می توان در دو نوع بافر Tris Acetate EDTA (TAE) و یا Tris Boric EDTA (TBE) تهیه نمود. باید توجه نمود که ژل را با هر نوع بافری که تهیه می شود باید در همان نوع بافر نیز الکتروفورز نمود. در این مطالعه با توجه به اندازه قطعات از ژل 1 درصد استفاده شد. مقدار 0/16 گرم از پودر آگارز توزین و در 20 میلی لیتر از محلول TAE با حرارت تا حد جوشیدن، حل شد. پس از سرد شدن آگارز تا حدی که در حال بسته شدن باشد در قالب های مناسب که حاوی شانه الکتروفورز بود ریخته شد. مقادیر مناسب از نمونه های DNA با 2 میکرو لیتر از 6X Loading Buffer مخلوط و در هر چاهک از ژل ریخته شد. زمان الکتروفورز برای هر نمونه بسته به اندازه قطعات متفاوت است. پس از اتمام الکتروفورز (در بافر TAE 1X و ولتاژ 120 V)، از شناور سازی ژل در محلول سایبر برای رنگ آمیزی ژل استفاده شد. کمپلکس حاصل در مقابل نور UV قابل رویت خواهد بود. پس از رنگ آمیزی ژل ها در دستگاه ژل داک¹ قرار گرفته و از آن ها عکس گرفته می شود.

3-3-9- انجام هضم آنزیمی دوباره جهت تأیید کلونینگ

هضم آنزیمی دوگانه قطعات Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 کلون شده در وکتور psi-checkII توسط آنزیم های هضم کننده XhoI و NotI انجام گرفت. این آزمایش جهت تأیید صحت قطعات کلون شده در وکتور صورت گرفت. انتظار می رفت این واکنش برش باعث جدا شدن قطعات کلون شده و مشاهده قطعه به اندازه طول ژن مورد نظر در روی ژل آگارز شود. برای این واکنش از مقادیر ذکر شده در جدول زیر استفاده گردید و با توجه به عملکرد سریع آنزیم ها واکنش به مدت 20 دقیقه انجام گرفت و سپس با انکوباسیون به مدت 5 دقیقه در دمای 80 درجه سانتی گراد آنزیم ها غیرفعال گشتند.

جدول 3-7- مواد و مقادیر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی دوگانه برای پلاسمید مورد نظر

جز واکنش	حجم (μl)
وکتور استخراج شده	2
آنزیم XhoI	0.5
آنزیم NotI	0.25
10X Buffer	2
H ₂ O	15.25
Total volume	20

جدول 3-8- مواد و مقادیر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی دوگانه برای ژن LINGO-1

جز واکنش	حجم (μl)

¹ Gel Doc

قطعه LINGO-1	6
آنزیم XhoI	0.5
آنزیم NotI	0.25
10X Buffer	2
H ₂ O	11.25
Total volume	20

جدول 3-9- مواد و مقادیر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی دوگانه برای ژن Bcl2L1

جز واکنش	حجم (μl)
قطعه Bcl2L1	3
آنزیم XhoI	0.5
آنزیم NotI	0.25
10X Buffer	2
H ₂ O	14.25
Total volume	20

جدول 3-10- مواد و مقادیر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی دوگانه برای ژن Sox-1

جز واکنش	حجم (μl)
قطعه Sox-1	2
آنزیم XhoI	0.5
آنزیم NotI	0.25
10X Buffer	2
H ₂ O	15.25
Total volume	20

پس از انجام تأیید با روش هضم آنزیمی دوگانه، نمونه های تأیید شده جهت انجام توالی یابی و بررسی اینکه در توالی های کلون شده جهشی وجود نداشته باشند به آزمایشگاهی که این عمل در آن انجام می گرفت ارسال گردید و نتایج بررسی شدند.

3-3-10 کشت سلول های HEK 293T

در این آزمایش از سلول های HEK 293T جهت ترانسفکشن استفاده شد. رده سلولی HEK از سلول کلیه جنینی انسان که در محیط کشت رشد می کنند مشتق می شوند. سلول های HEK، در ابتدای دهه 70، به وسیله ترانسفورماسیون محیط کشت سلول های نرمال کلیه جنینی انسان با DNA جدا شده آدنووایروس 5 بدست آمد. ترانسفورماسیون این سلول با آدنووایروس اولین بار توسط Frank Graham انجام شد.

شماره 293 مربوط به شماره گذاری آزمایشات توسط Graham است. بنابراین HEK293 محصول آزمایش 293ام بود. آنالیز بعدی نشان داد که ترانسفورماسیون به وسیله یک قطعه داخل شونده شامل حدوداً 4/5 کیلوباز از بازوی چپ ژنوم ویروس که به درون کروموزوم 19 انسانی وارد شده بود ایجاد شده است. یک واریانت مهم این رده سلولی، 293T است که علاوه بر آن دارای SV40 large T antigen است و اجازه تکثیر اپی زومال پلاسمید ترانسفکت شده که محتوی ¹ori SV40 است، را می دهد. سلول های HEK293T، مورفولوژی سلول های اپیتلیال را دارند و از بهترین رده های سلولی برای بیان ژن نو ترکیب هستند.

سلول های HEK 293T خیلی راحت رشد می کنند و به آسانی ترانسفکت می شوند به همین دلیل این سلول ها به میزان زیادی در تحقیقات زیست شناسی سلولی برای سال های زیادی مورد استفاده قرار گرفته اند. این سلول ها همچنین در صنعت بیوتکنولوژی برای تولید پروتئین ها و ویروس های درمانی مورد نیاز در ژن درمانی مورد استفاده قرار می گیرند.

برای کشت این سلول ها از ویال منجمد ذخیره سلولی که در 178- درجه سانتی گراد (تانک ازت) قرار داشت استفاده شد. سلول ها به سرعت از تانک ازت خارج شده و پس از رسیدن به دمای محیط در بن ماری، سلول ها در محیط DMEM تازه (حاوی 2mM گلوتامین و پنی سیلین- استرپتومایسین 1X) و 10% FBS² برده می شدند. پس از سانتریفوژ و دور ریختن محیط رویی (تا غلظت ماده سمی DMSO از بین برود)، سلول ها در محیط DMEM و 10% FBS سوسپانسیون شده و به فلاسک 25cm منتقل می گردیدند. سپس سلول ها در انکوباتور CO₂ در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار گرفتند. رشد و وضعیت سلول ها روزانه بررسی می گردید.

3-3-11- ترانسفکت سلول های HEK 293T با وکتور حاوی miR-184 به روش کلسیم

فسفات جهت ساخت ویروس

از سلول های HEK 293T برای ترانسفکت و وارد کردن وکتورهای کلون شده استفاده شد. دلیل استفاده از این سلول ها راحتی ترانسفکت آن ها و رشد سریع این سلول ها می باشد. سلول های HEK 293T با تعداد پاساژ پائین (کمتر از 30 پاساژ) یک بار فریز و بعد دفریز شدند، در واقع هربار از سلول های تازه دفریز شده استفاده می شد. سلول ها داخل فلاسک T75 کشت داده شدند. روز بعد داخل پلیت 10cm برده شدند و هنگامی که تراکم سلول ها به 70-80% رسید آماده ترانسفکت بودند. سر حال بودن سلول ها در این مرحله بسیار ضروری است و سلول ها باید به صورت مناسب و یک دست کشت شده باشند.

دو ساعت قبل از ترانسفکت، محیط سلول ها با محیط DMEM حاوی 10% FBS به آرامی تعویض شد (اگر سلول ها رشد خوبی نداشته اند نیازی به تعویض محیط نیست).

¹ Origin of replication

²Fetal Bovine Serum

مواد مورد استفاده: بافر (1x) TE، محلول (2.5M) CaCl_2 ، محلول HBSS (2X)، آب مقطر بافری شده با HEPES

مراحل کار به شرح زیر می باشد:

شب قبل از ترانسفکت، باکتری حاوی پلاسمیدهای بسته بندی ویروس (pMD2.G, psPAX2) و پلاسمید مورد نظر در محیط LB broth حاوی آنتی بیوتیک مناسب کشت داده شدند. پس از 16 ساعت، استخراج پلاسمید با کیت انجام شد. جذب نوری هر یک با دستگاه بیوفتومتر خوانده شد تا غلظت پلاسمید های تخلیص شده بدست آید.

برای هر پلیت که قرار بود ترانسفکت شود ترتیب اضافه شدن مواد داخل فالكون 15 میلی لیتر (حجم 2100 میکرولیتر برای هر پلیت 10cm) به شرح زیر است:

1- آب (میزان لازم تا رساندن حجم نهایی به 2100 میکرولیتر)

2- سپس 33 میکرولیتر بافر TE 1X به آن اضافه گردید.

3- 24 میکروگرم مجموع پلاسمید های بسته بندی ویروس (pMD2.G, psPAX2) و پلاسمید مورد نظر (pLentiIII) به عنوان کنترل یا حاوی (pLentiIII-miR-184) به محلول فوق اضافه و ورتکس گردید.

4- در مرحله بعد 105 میکرولیتر محلول (2.5M) CaCl_2 ، به آن اضافه و مخلوط شد.

5- سپس 1050 میکرولیتر محلول HBSS (2X) به صورت قطره قطره و در حال ورتکس، به محلول مورد نظر اضافه شد. اضافه کردن محلول HBSS به صورت قطره قطره و وجود فاصله حداقل 1 ثانیه ای بین دو قطره جهت رسیدن به درصد ترانسفکت بالا بسیار مهم می باشد. زیرا در این حالت مولکول های DNA فرصت کافی جهت ایجاد دانه های مناسب جهت ورود به سلول را خواهند یافت.

6- مخلوط مورد نظر به مدت یک دقیقه در معرض ورتکس شدید قرار داده شده، سپس به مدت 10 تا 15 دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. محلول حاصل باید کمی کدورت ابری شکل داشته باشد. در نهایت این مخلوط قطره قطره به پلیت اضافه و به مدت 16-14 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد حاوی 5% CO_2 انکوبه گردید. پس از آن، محیط کشت سلول های ترانسفکت شده با محیط تازه تعویض شد.

3-3-12 جمع آوری ویروس و فیلتر کردن آن

پس از ترانسفکت سلول های HEK 293T با وکتورهای pMD2.G و psPAX2 و pLentiIII حاوی ژن miR-184، ویروس های حاوی ژن miR-184 شروع به پکیج شدن و تولید می کنند. این سلول ها به صورت دائم در حال تولید این ویروس ها خواهند بود و به همین دلیل باید این ویروس ها جمع آوری شوند.

برای این کار به مدت 3 روز و هر 24 ساعت یکبار محیط کشت روی سلول های HEK 293T ترانسفکت شده جمع آوری شده و با توجه به این که این محیط برداشته شده مقادیر زیادی پروتئین و اجسام حاصله از سلول های مرده دارد، قبل از استفاده با استفاده از فیلتر برای پاک سازی محیط و

جداسازی ویروس‌ها فیلتر می‌شوند. در نهایت ویروس‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش اولترافیلتراسیون تغلیظ می‌شوند.

3-3-13 کشت سلول‌های Neural progenitor stem cells

در این آزمایش از سلول‌های NPSC جهت ترانسداکشن استفاده شد. این رده سلولی از سلول‌های iPSC که در محیط کشت رشد می‌کنند مشتق می‌شوند. این سلول‌ها از جمله سلول‌های بنیادی هستند که پیش‌ساز سلول‌های عصبی بوده و می‌توانند رده‌های مختلف این دسته از سلول‌ها را تولید کنند.

برای کشت این سلول‌ها از محیط DMEM/F12 تازه و 10% FBS¹ و فاکتورهای رشد L-Glutamine(1X), bFGF(40ng), EGF(20ng), N2-supplement(1X), Non-Essential amino acids(NEAA)1X برده می‌شدند. پس از سانتریفوژ و دور ریختن محیط رویی (تا غلظت ماده سمی DMSO از بین برود)، سلول‌ها در محیط ذکر شده به فلاسک 25cm منتقل می‌گردیدند. سپس سلول‌ها در انکوباتور CO₂ در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. رشد و وضعیت سلول‌ها روزانه بررسی می‌گردید.

برای انجام مراحل تمایز در سلول‌های NPSC، آن‌ها را در محیط DMEM/F12 به همراه 10% FBS و فاکتورهای رشد bFGF(20ng), N2-supplement(1X), NEAA(1X), IGF-1(100ng/mL), Forskolin(20ng/mL), Noggin(100ng/mL), T3(3nM), NT3(2ng/mL) کشت می‌دادیم.

لازم به ذکر است که سلول‌های NPSC ترانسداکت شده و گروه کنترل طبق پروتکل موناکو و همکاران کشت و تمایز داده شدند و نوع و غلظت فاکتورهای رشد مطابق پروتکل ذکر شده می‌باشد.

3-3-14 ترانسداکت سلول‌های NPSC با استفاده از ویروس‌های ساخته شده

تعداد مناسبی از سلول‌های NPSC در این مطالعه، برای هر آزمایشی، در کف پلیت‌های مناسب (سایز پلیت با توجه به آزمایش مدنظر انتخاب می‌شد). کاشته شده و سپس با نسبت متناسب ویروس‌های جمع‌آوری شده همراه با محیط کشت DMEM/F12 حاوی 10% FBS به همراه فاکتورهای مورد نیاز روی سلول‌ها ریخته می‌شد.

3-3-15 استخراج RNA (Total RNA)

برای استخراج Total RNA از سلول‌ها از کیت‌های گوناگونی استفاده می‌شود. این کیت‌ها براساس اختلاف فاز فنل - کلروفرم یا براساس قدرت تفکیک ستون‌های کوچک جداسازی کار می‌کنند. گرچه کیت‌های براساس فنل - کلروفرم دارای میزان تخلیص بالاتری هستند ولی RNA تخلیص شده با ستون سالم تر می‌باشد. تمامی سرسمپلرها (تیپ‌ها) و میکروتیوپ‌های مورد استفاده باید از نوع RNase- DNase free بوده و همه مراحل سانتریفوژ باید در دمای 4 درجه سانتی‌گراد انجام شود.

¹Fetal Bovine Serum

مواد مورد نیاز به این شرح می باشد: (CinnaGen, Iran) RNX-Plus، کلروفرم، اتانول 100٪، اتانول 70٪، آب استریل یا بافر رقیق کننده RNA (RNase - free) مراحل کار به شرح زیر می باشد:

1. سلول های ترانسداکت شده NPSC تریپسینه شدند تا از کف پلیت کنده شوند و سپس در فالدون ریخته شدند و در دور 1200 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شده و محیط رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل در PBS حل شده و مجدد در همان شرایط سانتریفیوژ و محیط رویی خارج شد.
 2. یک میلی لیتر RNX-Plus سرد به سلول های رسوب کرده اضافه شده و خوب مخلوط شد. سپس سوسپانسیون وارد یک میکروتیوب 1/5 میلی لیتر گردید. اگر در این مرحله کلامپ سلولی ایجاد شد باید به مدت 1 دقیقه ورتکس شود. بعد از ورتکس این مخلوط 5 دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد.
 3. 200 میکرولیتر کلروفرم به محتویات میکروتیوب اضافه کرده و یک دقیقه بشدت تکان داده شد. سپس 5 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد قرار داده شد.
 4. سانتریفوژ 4 درجه سانتی گراد، 20 دقیقه در 12000 rpm انجام شد.
 5. جداسازی محلول رویی (فاز آبی) و انتقال آن به میکروتیوب جدید صورت گرفت.
 6. هم حجم فاز آبی (محلول رویی) به آن اتانول 100٪ سرد اضافه گردید. سپس به آرامی مخلوط کرده و به صورت Overnight در دمای 20- درجه سانتی گراد قرار داده شد.
 7. سانتریفوژ 4 درجه سانتی گراد، 45 دقیقه در 12000 rpm و دور ریختن محلول رویی (رسوب سفیدرنگی دیده می شود) انجام شد.
 8. یک میلی لیتر اتانول 70٪ سرد اضافه و ورتکس کرده تا رسوب از ته لوله کنده شود
 9. سانتریفوژ 4 درجه سانتی گراد، 15 دقیقه در 12000 rpm صورت گرفت.
 10. محلول رویی دور ریخته شد و درب لوله 10 دقیقه باز ماند تا RNA رسوب کرده خشک شود.
 11. حدود 30-50 میکرولیتر آب RNase-DNase free اضافه گردید و نهایتاً محلول حاصل، جهت نگهداری به فریزر 70- درجه سانتی گراد منتقل شد.
- غلظت RNA استخراج شده تعیین شده از آن برای بررسی mRNA و مرحله بعدی که cDNA سازی می باشد استفاده گردید.

3-3-1- کنترل کیفیت RNA استخراج شده

برای کنترل کیفیت استخراج ابتدا 5 میکرولیتر از RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز 1/5٪ که در شرایط RNase free تهیه شده بود الکتروفورز گردید. سالم بودن باندهای ریبوزومی و قدرت آن ها نشانگر قدرت استخراج و سالم بودن RNA می باشد.

نکته دیگری که در استخراج RNA حائز اهمیت است، میزان پروتئینی است که به همراه آن استخراج می شود. برای تعیین آلودگی های پروتئینی و غیره، 2 میکرولیتر از محصول استخراج را به حجم 100 میکرولیتر رسانده و جذب آن در طول موج های 260 و 280 نانومتر اندازه گیری شد که

نسبت میزان جذب 260 به 280 در بهترین حالت باید برابر با 2 باشد. هرچه این میزان کمتر از 2 باشد مبین بالا بودن آلودگی پروتئین و نامناسب بودن استخراج است. با توجه به این نکته که در دستگاه بیوفتومتر به کار گرفته شده $A_{260}=1$ معادل $40 \mu\text{g RNA/ml}$ است و با بکارگیری فرمول:

$$40 \mu\text{g/ml RNA} \times \text{اندازه گیری شده } A_{260} \times \text{ضریب رقت} = \text{X } \mu\text{g/ml RNA}$$

غلظت RNA بدست آمد.

3-3-16- ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده

مراحل ساخت cDNA به شرح زیر انجام شد:

1. 1 میکروگرم از RNA تخلیص شده در دو لوله 200 میکرولیتر جداگانه، با 1/5 میکرولیتر از پرایمر 10 پیکومول random hexamer مخلوط گردیده و حجم در هر تیوب با آب RNase-DNase free به 13 میکرولیتر رسانده شد.

2- درب لوله ها را بسته و به مدت 10 دقیقه در دمای 70 درجه سانتیگراد در ترموسایکلر گذاشته می شود.

3- سپس لوله ها فوراً بر روی یخ گذاشته شده و مواد زیر مطابق جدول 3-11 به آن افزوده شد.

جدول 3-11- مواد مورد نیاز برای واکنش ساخت cDNA

اجزا تشکیل دهنده	حجم (μl)
5X Buffer (Fermentas)	4
dNTP(10mM)	2
Reverse transcriptase(Fermentas)	1

1- سپس درب لوله را بسته و طبق پروتکل دمایی جدول 3-12 در ترموسایکلر گذاشته شد.

جدول 3-12- شرایط دمایی واکنش ساخت cDNA

زمان	دما
10 دقیقه	25 درجه سانتیگراد
10 دقیقه	37 درجه سانتیگراد
45 دقیقه	42 درجه سانتیگراد
10 دقیقه	75 درجه سانتیگراد (برای غیرفعال کردن آنزیم)

3-3-17- انجام واکنش Real time PCR برای بررسی بیان ژن ها

جهت بررسی کمی بیان ژن های هدف از سیستم Real-Time PCR به صورت نسبی¹ استفاده شد. از ژن $\beta 2M$ به عنوان ژن رفرانس برای نرمال کردن نتایج Real-Time PCR ژن ها استفاده شد. واکنش Real-Time PCR طبق جداول زیر انجام شد.

¹ Relative Quantification

جدول 3-13- اجزای لازم برای واکنش Real-Time PCR در دستگاه Light Cycler 1.5X

اجزا تشکیل دهنده	حجم (μl)
Master Mix(2X Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, Fermentas)	6.5
Forward Primer (10pmol)	0.5
Reverse Primer (10pmol)	0.5
Template (cDNA)	1
diH ₂ O	4.5
Total volume	13

جدول 3-14- برنامه زمانی مراحل واکنش Real-Time PCR ژن ها

سیکل	زمان	دما	مرحله
1	1 دقیقه	95° C	Enzyme activation
40	5 ثانیه	94° C	Denaturation
	30 ثانیه	60° C	Annealing and Extention
قرائت نشر فلورسانس توسط دستگاه در انتهای مرحله طویل شدن در کانال FAM/SYBER بود.			

بلافاصله بعد از انجام واکنش PCR برنامه Melt (طبق جدول 3-15) بر روی نمونه ها انجام شد.

جدول 3-15- برنامه زمانی Melting

مراحل	دمای اولیه	دمای انتهایی
شیب حرارتی	65° C	95° C
افزایش حرارتی	0/2 درجه سانتی گراد برای هر دفعه افزایش حرارت	
زمان توقف	1 دقیقه برای اولین افزایش حرارت	
	50 ثانیه برای دفعات بعدی	
قرائت طیف نشری	جمع آوری طیف نشری فلورسانس حاصل از SG از کانال FAM/SYBER	

پس از آنالیز منحنی ذوب، در نهایت نتایج به صورت سیکل آستانه¹ گزارش شد و برای بررسی بیان ژن ها از برنامه REST² استفاده شد.

¹ Cycle Threshold (C_T)

² Relative Expression Software Tool

3-4 ترانسفکشن سلول های HEK-T293 با لیپوفکتامین:

برای انجام ترانسفکشن بسته به نوع پلیتی که سلول موردنظر در آن کشت داده شده است، میزان مشخصی از DNA را به همراه محیط Opti-MEM مخلوط کرده و 5 دقیقه انکوبه می کنیم. سپس محیط Opti-MEM را با میزان مشخصی از لیپوفکتامین مخلوط کرده و پس از 5 دقیقه انکوباسیون، این مخلوط را به محلول حاوی DNA موردنظر اضافه می کنیم و 20 دقیقه انکوباسیون می کنیم. مقادیر مورد نیاز برای انجام ترانسفکشن در جدول زیر آورده شده است.

جدول 3-16- مقادیر مورد نیاز برای ترانسفکشن با لیپوفکتامین

غلظت DNA مورد استفاده	مقدار محیط مورد نیاز	مقدار لیپوفکتامین (μL)	پلیت مورد استفاده
200ng	100 μL	0.4	96well
800ng	500 μL	0.4	24well
1600ng	1mL	0.4	12well

3-5 تست لوسیفراز برای بررسی تأثیر miR-184 روی ژن های موردنظر:

تست لوسیفراز از جمله تست های مناسب برای بررسی نحوه تأثیر ژن ها روی یکدیگر و سیستم ژن های گزارش گر می باشد. در تست لوسیفراز، ابتدا تعداد 15 هزار سلول HEK-T293 را در پلیت های 96 خانه به همراه محیط بدون آنتی بیوتیک کشت داده و فردای آن روز سلول ها را با وکتورهای حاوی ژن های موردنظر (psi-checkII/LINGO-1, psi-checkII/Bcl2L1, psi-checkII/Sox-1) با روش لیپوفکتامین ترانسفکت می کنیم. در این روش به تعدادی از سلول ها علاوه بر اضافه کردن وکتورهای موردنظر، وکتور pLentiIII-miR-184 را نیز اضافه می کنیم. سلول هایی که تنها وکتور حاوی ژن موردنظر را دارند، گروه کنترل محسوب می شوند و سلول هایی که علاوه بر وکتورهای گفته شده، وکتور حاوی miR-184 را دارا می باشند، گروه تیمار شده محسوب می شوند. 48 ساعت بعد از ترانسفکشن، سلول ها را برای انجام تست لوسیفراز آماده می کنیم. در تست لوسیفراز پس از ترانسفکشن، ابتدا محیط روی سلول ها را دور ریخته، سپس 20 μL از محلول لیزکننده (Passive Lysis Buffer [PLB]) را روی سلول ها ریخته و برای مدت 15 دقیقه با دور 70000rpm شیک می کنیم. سپس 5 μL از نمونه به همراه 15 μL از محلول (Luciferase Assay Reagent II) را میکس کرده و داخل دستگاه قرار می دهیم. دستگاه عددی را به ما نشان می دهد. سپس به این مخلوط، 20 μL از محلول Stop and Glow را اضافه کرده و پس از ورتکس داخل دستگاه می گذاریم که عدد دوم را بخواند. از تقسیم عدد دوم به عدد اول و مقایسه با نمونه کنترل میزان کاهش یا افزایش بیان ژن مشخص می شود.

در وکتور طراحی شده برای انجام تست لوسیفراز در این پروژه (psi-checkII)، دو ژن که نشر نور فلورسنتی را بر عهده دارند (hRluc و hLuc+)، حضور دارند. این ژن ها تحت پروموتور T7 قرار گرفته اند و به ترتیب در بالا دست و پایین دست ژن کلون شده قرار می گیرند و اگر miRNA مورد نظر ژن را مورد هدف قرار دهد به آن اتصال پیدا کرده و در نتیجه میزان نور فلورسنت نشر شده از ژن hLuc+ کمتر می شود.

برای ترانسفکشن میزان 200ng از DNA موردنظر را با 0.4µL لیپوفکتامین و 25µL Opti-MEM مخلوط کرده و 20 دقیقه انکوبه می کنیم. پس از 20 دقیقه مخلوط را روی سلول ها ریخته و با اضافه کردن miR-184 تعدادی از نمونه ها را تیمار کرده و 48 ساعت بعد تست را انجام می دهیم. مقادیر استفاده شده برای انجام تست لوسیفراز در جدول زیر آورده شده است.

جدول 3-17- مقادیر لازمه برای انجام ترانسفکشن در تست لوسیفراز

وکتور-psi-checkII/	لیپوفکتامین	DNA	Opti-MEM(µL)	miR-184	تعدادسلول در پلیت 96well	حجم نهایی (µL)
Bcl2L1	0.4µL	100ng	25µL	100ng	15000	50 µL
LINGO-1	0.4 µL	100ng	25µL	100ng	15000	50 µL
Sox-1	0.4 µL	100ng	25µL	100ng	15000	50 µL

3-6 ایمونوسیتوشیمی برای بررسی بیان آنتی ژن های الیگودندروسیتی

ایمونوسیتوشیمی روشی برای تشخیص پروتئین ها و پپتیدهای سلولی است که در آن از بیومولکول های ویژه آن پپتیدها و پروتئین ها که غالباً آنتی بادی نامیده می شوند، استفاده می شود. این آنتی بادی ها به یک گزارش گر مانند فلوروفور، آنزیم و یا رنگ فلورسنتی متصل هستند و بسته به نوع گزارش گر متصل به آنتی بادی، روش تشخیص بیان آنتی ژن نیز متفاوت می باشد. در این آزمایش، آنتی بادی ثانویه ما به HRP متصل می باشد. برای انجام این آزمایش، سلول های NPSCs در محیط کشت تمایزی کشت داده شدند و برای بررسی میزان تمایز آن ها در روزهای 4,5,6 سلول ها را با تلاقی¹ 30٪ فیکس کردیم. برای فیکس سلول ها کمی پارافرمالدهید 4٪ سرد به محیط روی سلول ها اضافه کرده و پس از 5 دقیقه محیط به همراه پارافرمالدهید را دور می ریزیم. سپس روی سلول ها پارافرمالدهید 4٪ سرد را اضافه کرده و 20 دقیقه در یخچال و 5 دقیقه در دمای اتاق قرار می دهیم. بعد از قرار دادن در دمای اتاق، پارافرمالدهید را دور ریخته و با PBS، 2بار شست وشو می دهیم. اگر آنتی بادی مورد نظر سطحی باشد، سرم بزی را با غلظت 5٪ اضافه کرده و 45 دقیقه در دمای اتاق قرار داده و سپس آنتی بادی اولیه را با غلظت مشخص شده در پروتکل آنتی بادی که با

¹ Confluency

BSA0.1% رقیق شده است، روی سلول ها ریخته و یک شبانه روز در یخچال انکوبه می کنیم. اگر آنتی بادی مورد نظر داخل سیتوپلاسمی باشد، قبل از اضافه کردن سرم بزی، 3 بار و هر بار برای مدت 5-10 دقیقه سلول ها را با 0.4% Triton-X100 شست و شو داده و پس از 2 بار شست و شو با PBS، مراحل بعدی را تکرار می کنیم. بعد از قرار گرفتن سلول ها به مدت یک شبانه روز در آنتی بادی اولیه، سلول ها را 2 بار با PBS شست و شو می دهیم. سپس با 0.1% Tween 3 بار و هر بار 5 دقیقه شست و شو می دهیم. پس از شست و شو، سلول ها را برای مدت 30 دقیقه با 1% BSA در دمای اتاق انکوبه می کنیم. پس از انکوباسیون، آنتی بادی ثانویه را با غلظت 1:1000 روی سلول ها ریخته و یک ساعت در انکوباتور قرار می دهیم. سپس سلول ها را با PBS شست و شو داده و محلول (DAB(3,3' Diaminobenzidine) را به مدت 5 دقیقه به سلول ها اضافه کرده و پس از 5 دقیقه سلول ها را با آب مقطر می شویم. سپس با همتوکسیلین سلول ها را رنگ کرده و پس از 20 ثانیه سلول ها را با آب مقطر شست و شو می دهیم تا زمانی که رنگ حاصل از همتوکسیلین از بین برود. سپس زیر میکروسکوپ میزان بیان آنتی ژن های متصل به آنتی بادی را مشاهده می کنیم و نمونه های تیمار شده را با نمونه کنترل مقایسه می کنیم.

3-7 وسترن بلاتینگ روی نمونه های پروتئینی استخراج شده از سلول های هفته دوم و سوم:

وسترن بلات یکی از روش های ارزیابی پروتئین ها بر پایه روش های ایمونولوژیک می باشد که در حیطه های مختلف از جمله فرآیندهای پایین دستی در تولید پروتئین های نو ترکیب می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

وسترن بلات برای شناسایی پروتئین و ارزیابی یکپارچگی آن به کار می رود که از دو مرحله الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید¹ و لکه گذاری² تشکیل شده است. از تکنیک الکتروفورز برای جداسازی مخلوطی از پروتئین ها، بررسی زیرواحدهای تشکیل دهنده، تأیید هوموژن بودن یک نمونه پروتئینی و برای خالص سازی پروتئین ها برای کاربردهای دیگر استفاده می شود. SDS_PAGE در حقیقت یک الکتروفورز یک بعدی است که در آن از بستر پلی آکریل آمید و بیس آکریل آمید به عنوان پایه ژل استفاده می شود. در این پروسه با استفاده از SDS همه پروتئین ها بار منفی گرفته و به این ترتیب حرکت آن ها بر روی ژل براساس وزن مولکولی آن ها صورت می گیرد. در الکتروفورز ژل آکریل آمید (PAGE) در اثر میدان الکتریکی تولید شده پروتئین ها از میان منافذ موجود در ماتریکس ژل حرکت می کنند. سرعت حرکت پروتئین ها توسط منافذ ژل و همچنین سایز، بار و شکل پروتئین تعیین می شود. در مرحله بلاتینگ پروتئین های الکتروفورز شده از ژل به کاغذ نیتروسولوز یا PVDF منتقل شده و سپس با استفاده از آنتی بادی اختصاصی مورد شناسایی قرار می گیرند. در الکتروفورز یک بعدی تحت شرایط دناتوره کننده (به عنوان مثال در حضور SDS) همزمان با عبور پروتئین ها از

¹ Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)

² Blotting

میان ماتریکس ژل پلی آکریل آمید به سمت الکتروود آند (+)، پروتئین‌ها براساس سایز مولکولی از یکدیگر تفکیک می‌شوند. ژل مورد استفاده در این تکنیک به صورت دو قسمتی که شامل بخش اصلی ژل به نام Resolving/Separating/Running Gel است و بر روی آن بخش Stacking Gel قرار می‌گیرد که این مجموعه توسط صفحات شیشه‌ای در دستگاه الکتروفورز حمایت می‌شوند.

برای انجام آزمایش باید در ابتدا نمونه‌های پروتئینی مورد استفاده در این تکنیک به صورت محلول درآیند که این عمل با جوشاندن آن‌ها در حضور SDS صورت می‌گیرد. به منظور احیاء باندهای S-S موجود در پروتئین‌ها و کمک به محلول سازی آن‌ها معمولاً از ترکیبات احیاء کننده نظیر DTT/2-ME نیز استفاده می‌شود. ابتدا براساس تعداد نمونه‌های مورد بررسی، سایز ژل مورد نظر، سپس پلیت‌های شیشه‌ای مناسب با حجم نمونه را انتخاب می‌کنیم. براساس حجم نمونه، Spacer Plate‌هایی با اندازه‌های 0.75، 1 و 1.5 میلی‌متری وجود دارد، که هر چه حجم پروتئین بیشتری داشته باشیم از اندازه بزرگتر (1.5 میلی‌متر) استفاده می‌کنیم. شیشه دیگری به نام Short Plate وجود دارد که بر روی Spacer Plate قرار می‌گیرد. قبل از شروع کار شیشه‌ها را با آب فراوان شسته و با آب مقطر دیونیزه آبکشی می‌کنیم تا هیچ گونه لکه یا اثری بر روی آن نباشد. سپس با الکل 70٪ تمیز و کاملاً خشک می‌کنیم. سپس شیشه‌ها را بر روی هم قرار داده و درون پایه‌ها فیکس می‌کنیم.

برای تهیه هر ژل ابتدا تمام اجزاء مورد نیاز را متناسب با درصد مورد نظر در یک لوله فالكون 50 میلی‌لیتری اضافه نموده فقط TEMED & APS را که نقش کاتالیزوری دارند در انتها اضافه می‌کنیم چون بعد از افزودن آن‌ها باید بلافاصله مواد تشکیل دهنده ژل را به آرامی مخلوط کرد و سریعاً در فضای بین پلیت‌های شیشه‌ای ریخت.

پس از اطمینان از بستن ژل لایه الکل رویی را دور ریخته و سطح ژل را با آب مقطر یا بافر تریس pH=8.8 به طور کامل می‌شوئیم. سپس با کاغذ خشک کن کاملاً خشک کرده و بعد Stacking gel را براساس حجم مورد نیاز و غلظت 5٪ مطابق جدول مربوطه در یک لوله فالكون 15 میلی‌لیتری همانند روش قبل آماده کرده و روی Resolving gel تا نزدیکی لبه بالایی پلیت‌های شیشه‌ای می‌ریزیم.

بلافاصله شانه را به آرامی در محلول Stacking gel فرو می‌کنیم به گونه‌ای که ژل تمامی منافذ و فضاهای اطراف و بین شانه را پر کند. ضمناً دقت می‌کنیم تا هیچ گونه حباب هوایی زیر چاهک‌ها یا اطراف آن‌ها ایجاد نشود. زمان مورد نیاز برای بستن ژل در دمای اتاق حدود 15-20 min است.

پس از بستن ژل، مجموعه ژل آماده و پلیت‌های شیشه‌ای را در جایگاه خود در تانک دستگاه الکتروفورز قرار داده و آن را در جای خود محکم می‌کنیم. سپس محفظه بالایی و پایینی تانک را با بافر الکتروفورز پر کرده به گونه‌ای که کاملاً الکترودهای آند و کاتد را بپوشاند. سپس با دقت و بدون آسیب زدن به دیواره‌های چاهک، شانه را از داخل ژل بیرون می‌آوریم.

برای آماده کردن نمونه های پروتئینی، آن ها را به نسبت 4:1 با sample buffer 5X در یک لوله اپندورف 1/5 مخلوط نموده و در دمای 100 درجه به مدت 5-10 دقیقه می جوشانیم. (دقت شود در صورت عدم استفاده از مهار کننده های پروتئاز در بافر لیز کننده، قبل و بعد از اضافه نمودن SDS sample buffer تا زمان جوشاندن آن ها، نمونه ها را روی یخ نگهداری می کنیم تا پروتئینازهای موجود در نمونه سبب تخریب آن نشوند.)

نمونه های آماده شده و استاندارد وزن مولکولی (مارکر پروتئینی) را به ترتیب مورد نظر به وسیله سمپلر در چاهک های مربوطه به آرامی و با دقت می ریزیم تا هر نمونه دقیقاً در چاهک مورد نظر قرار گیرد.

سپس سیم های رابط الکتروفورز را به طور صحیح به power supply وصل نموده و ولتاژ دستگاه را بر روی 150 ولت تنظیم کرده و ژل را run می کنیم. بعد از رسیدن رنگ بروموفنل به انتهای ژل، جریان را قطع کرده، پلیت های شیشه ای را باز کرده و به خوبی شسته و خشک می کنیم. بعد به آرامی شیشه ها را با استفاده از spacer از هم جدا کرده و قسمت Stacking gel را نیز با کمک spacer می بریم.

سینی ژل را از بافر انتقال 1X پر کرده، کاغذ نیتروسولولز یا PVDF را به اندازه ژل ها می بریم. کاغذ PVDF چون خیلی هیدروفوب است، ابتدا آن را چند ثانیه در متانول 100٪ گذاشته بعد با آب مقطر دیونیزه کاملاً می شوئیم (با غوطه ور کردن) و سپس آن را در بافر انتقال قرار می دهیم تا کاملاً خیس بخورد.

قاب مربوطه را داخل سینی ژل باز کرده و از طرف سیاه به ترتیب زیر شروع به تهیه ساندویچ بلاتینگ می کنیم:

1- طرف سیاه قاب

2- اسفنج

3- کاغذ صافی

4- ژل

5- غشاء نیتروسولولز یا (PVDF) در این مرحله با استفاده از یک غلتک، حباب های بین ژل و غشاء را از بین می بریم.

6- کاغذ صافی

7- اسفنج

8- طرف سفید قاب

بعد از تهیه ساندویچ و قراردادن آن داخل تانک، تا لبه بالایی قاب را با بافر انتقال 1X پر کرده و سپس در آمپر 400 mA به مدت 70-90 دقیقه run می کنیم. پس از پایان انتقال، ژل پلی آکریل آمید را با روش رنگ آمیزی کوماسی بلو به مدت یک شب رنگ آمیزی کرده و سپس با محلول رنگ-بر (اسید استیک 10٪) فیکس و رنگ بری می کنیم تا از میزان انتقال پروتئین ها مطمئن شویم. بعد آن

را داخل کیسه پلاستیک قرار داده و کاملاً با حرارت، اطراف آن را می‌بندیم که برای چند ماه قابل نگهداری است. برای ایمنوبلاتینگ ابتدا غشاء را در یک ظرف پلاستیکی قرار داده و روی آن محلول Blocking می‌ریزیم تا کاملاً آن را بپوشاند. سپس آن را به مدت 2 ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر انکوبه می‌کنیم.

موادی که برای مرحله بلاکینگ به کار می‌روند عبارتند از: Skimmed milk (شیر خشک) 0.5٪، ژلاتین 0.5٪، BSA 3-5٪.

به منظور رقیق کردن مواد بلاکینگ از بافر TBS 1X استفاده می‌کنیم. بعد از اتمام مرحله بلاکینگ، غشاء را باید با آنتی‌بادی اولیه انکوبه کنیم. آنتی‌بادی اولیه نیز باید به نسبت مشخص شده در Datasheet مربوط به همان آنتی‌بادی، در TBS 1X حاوی 0.5-2٪ بافر بلاکینگ، رقیق گردد. غشاء غوطه‌ور در آنتی‌بادی اولیه را روی شیکر قرار داده و به مدت یک شب در یخچال انکوبه می‌کنیم.

روز بعد محتویات آنتی‌بادی آن را درون یک لوله فالتون برای استفاده مجدد جمع‌آوری می‌کنیم (نگهداری در یخچال)، به منظور جلوگیری از آلوده شدن آنتی‌بادی می‌توان به آن سدیم آزاید اضافه کرد. بعد از برداشتن آنتی‌بادی اولیه، سه مرحله شستشوی 10-15 دقیقه با TBST یا TBS داریم. تمام مراحل شستشو باید بر روی شیکر انجام گیرد. بعد از شستشو نوبت به افزودن آنتی‌بادی ثانویه می‌رسد. آنتی‌بادی ثانویه نیز مانند آنتی‌بادی اولیه طبق دستورالعمل باید در TBS 1X رقیق شود. آنتی‌بادی ثانویه رقیق شده را با غشاء مجاور می‌کنیم و در دمای اتاق به مدت یک تا دو ساعت روی شیکر انکوبه می‌کنیم. آنتی‌بادی ثانویه مورد استفاده، HRP کنژوگه است. با توجه به نوع آنتی‌بادی اولیه که در چه حیوانی تولید شده باشد یعنی موش یا خرگوش، آنتی‌بادی ثانویه را انتخاب می‌کنیم. در پایان نیز باند اختصاصی پروتئینی را به روش لومینسانس شناسایی کردیم. براساس پروتکل کیت لومینسانس (Amerham, Roshe و غیره) ابتدا محلول آماده کار سوبسترای آنزیم HRP را با مخلوط نمودن حجم‌های مناسب از محلول‌های شماره 1 و 2 آماده می‌کنیم (در مجاورت نور نباشد) و بعد در اتاق تاریک زیر نور قرمز روی سطح غشاء می‌ریزیم. در اتاق تاریک قطعه‌ای از فیلم حساس را متناسب با اندازه غشاء بریده و آن را روی غشاء گذاشته و درب کاست محافظ را می‌بندیم. اجازه می‌دهیم فیلم به مدت 5 دقیقه با غشاء مجاور باشد تا اثر نور حاصل از واکنش آنزیم و سوبسترا بر روی فیلم نقش ببندد. سپس فیلم را خارج کرده و 2-3 دقیقه در محلول ظهور قرار داده تا فیلم باندهای حاصل را ظاهر شود و پس از شستشو دادن به مدت 1 دقیقه در آب، به مدت 2 دقیقه در محلول فیکساتور ثابت کرده سپس به مدت 1 دقیقه شستشو می‌دهیم.

3-8- آماده سازی پلاسمید برای تزریق:

میزان 0.5 – 1 µg از DNA پلاسمیدی را با رنگ Green buffer 1x مخلوط کرده و به حجم 100 میکرولیتر می‌رسانیم.

3-9- انجام آزمایش *in vivo*

موش های باردار 12.5 روزه را انتخاب کرده و با رعایت قوانین اخلاقی، میزان 200 واحد به ازای هر 20 گرم داروی بیهوشی کتامین زایلیزین را به صورت داخل صفاقی تزریق می کنیم. پس از بیهوش شدن موش و بررسی رفلکس موش، شکم آن را باز کرده و جنین ها را به آرامی از یک شاخه رحمی موش خارج کرده و پلاسمید آماده شده را به مغز موش ها تزریق می کنیم. پس از تزریق، با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن پالس 38 ولت را به میزان 5 میلی ثانیه ایجاد می کنیم. پس از انجام الکتروپوریشن، جنین ها را به آرامی وارد شکم کرده و بخیه می زنیم. باید مراقب باشیم که در حین جراحی جنین ها خشک نشوند. برای جلوگیری از این عمل از نرمال سالین استفاده می کنیم. هم چنین دمای بخش جراحی 37 درجه سانتیگراد باشد. پس از زدن بخیه موش ها را در قفس گذاشته و آب و غذای آن ها را در دسترسشان قرار می دهیم. پس از 2 روز موش ها را با روش CO₂ تزریق می کنیم تا موش بمیرد. سپس شکم موش ها را باز کرده و شاخه تزریق شده و کنترل را بیرون آورده و مغز آن ها را جدا می کنیم. استخراج RNA و پروتئین را انجام می دهیم (مشابه استخراج RNA و پروتئین گفته شده، تنها یک مرحله برای لیز بافت مغز اضافه می شود. بافر لیز کننده به همراه بافت داخل دستگاه لیز کننده برای مدت 15 دقیقه با حداکثر سرعت می گذاریم).

فصل چهارم

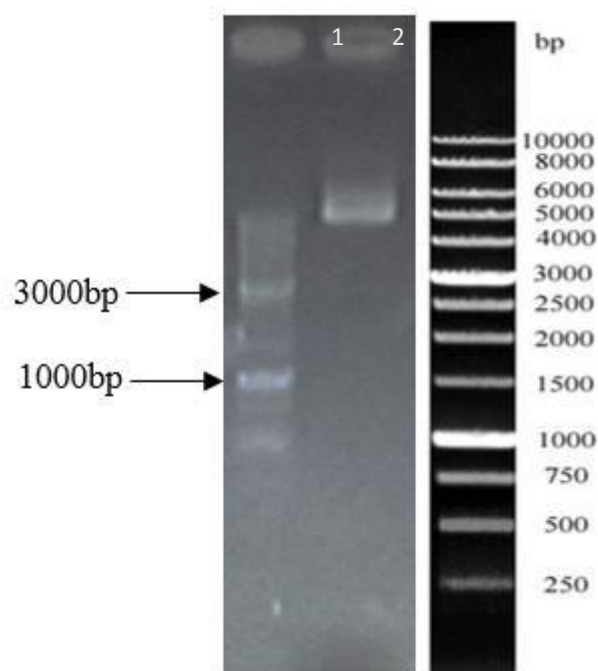
نتایج ویافته ها

1-4-1- نتایج مربوط به تهیه سازه مورد نیاز برای انجام پروژه

1-1-4- نتیجه استخراج پلاسمید pLentiIII-miR-184

پلاسمید pLentiIII-miR-184 که طبق نکات ذکر شده در بخش مواد و روش ها برای انجام این پروژه انتخاب گردید ابتدا از باکتری حاوی این پلاسمید پس از کشت 16 ساعته استخراج گردید و سپس این پلاسمیدهای استخراج شده روی ژل الکتروفورز 1٪ برده شد تا بررسی شود که پلاسمید به درستی استخراج شده است. از طرف دیگر این ژل نشان دهنده میزان غلظت پلاسمید استخراج شده نیز بود.

نتایج حاصل از الکتروفورز پلاسمید pLentiIII-miR-184 استخراج شده روی ژل آگارز در شکل شماره 1-4 دیده می شود.



شکل 1-4- چاهک اول نردبان ژنی 1kb خریداری شده از شرکت BioRon، چاهک دوم پلاسمید pLentiIII-miR-184

2-4-2- نتایج ترانسفکت سلول های HEK 293T با استفاده از پلاسمیدهای psPAX2,

pLentiIII-miR-184, pMD2G با روش کلسیم فسفات

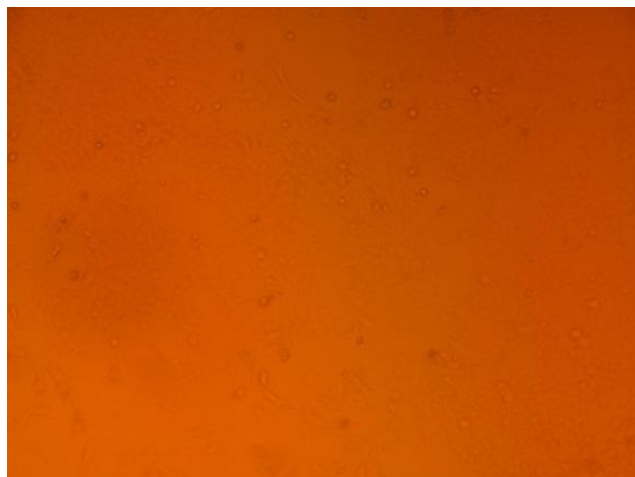
جهت بررسی عملکرد وکتور pLentiIII-miR-184 این وکتور را به همراه دو پلاسمید دیگر، psPAX2 و pMD2G با استفاده از روش کلسیم فسفات وارد سلول های HEK 293T گردید. آزمایش ترانسفکت سلول های HEK 293T با وکتور pLentiIII-miR-184 در صورت عملکرد صحیح با توجه به وجود ژن کد کننده پروتئین GFP در وکتور، باید همراه با سبز رنگ شدن سلول هایی که وکتور به درون آن ها راه یافته است، باشد. این موضوع به این دلیل می باشد که پروتئین فلورسنت سبز در زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز دیده می شود.

ترانسفکت سلول ها در دو گروه تیمار با وکتور pLentiIII-miR-184 و کنترل انجام گرفت. در گروه کنترل عمل ترانسفکت تنها با بافرهای روش کلسیم فسفات صورت می پذیرد و هیچ وکتوری به محیط کشت سلول های HEK 293T افزوده نمی گردد. قابل ذکر است که پلاسمیدهای psPAX2 حاوی gag بوده که تولید کننده پروتئین های سیتوپلاسمی ویروس می باشد و پلاسمید pMD2G حاوی ژن VSV-G می باشد که پروتئین های پوششی ویروس را بیان می کند. pLentiIII-miR-184 نیز حاوی miR-184 می باشد که در این پروژه مورد بررسی قرار می گیرد. این سه وکتور با روش کلسیم فسفات سلول های HEK 293 T را ترانسفکت می کنند و تولید ویروس در این سلول ها صورت می گیرد.

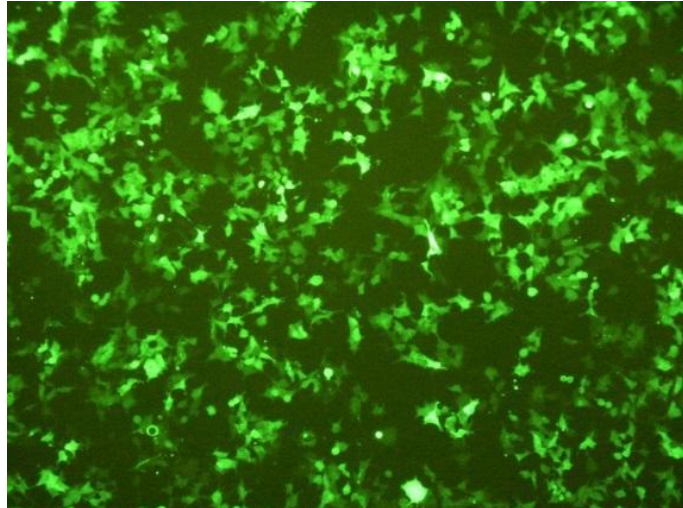
با توجه به ساختار وکتور pLentiIII ژن پروتئین فلورسنت سبز (GFP) تحت کنترل پروموتور CMV بیان می گردد. این پروموتور با استفاده از RNA پلی مرز II عمل رونویسی را انجام می دهد. از طرف دیگر ژن miR-184 نیز تحت کنترل همین پروموتور بیان می شود.

همانگونه که اشاره گردید در صورت انجام درست عمل ترانسفکشن و ورود وکتورها به درون سلول ها و همچنین عملکرد درست پروموتور سلول های ترانسفکت شده زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز دیده خواهند شد. از طرف دیگر در گروه کنترل با توجه به عدم افزوده شدن هیچ گونه وکتوری سلول ها نباید سبز شوند.

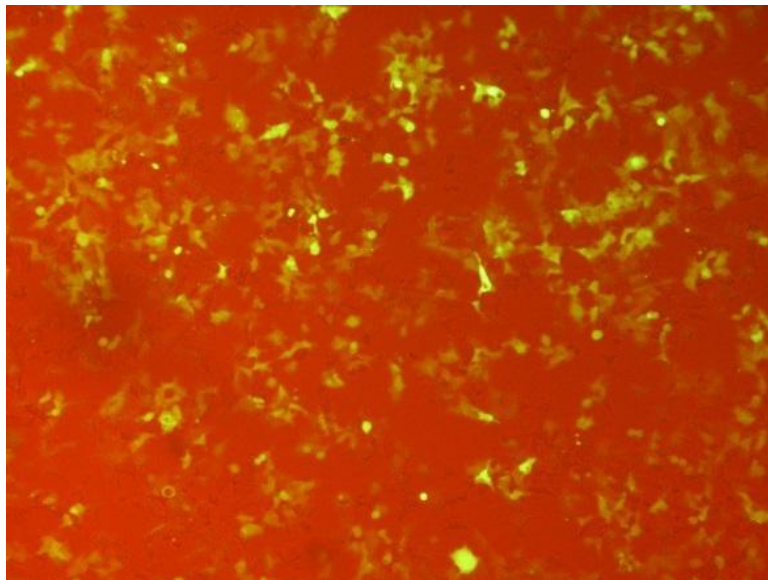
شکل 4-2- نشان دهنده سلول های HEK 293T زیر میکروسکوپ فلورسنت می باشد. در این شکل سلول ها با وکتور pLentiIII-miR-184 ترانسفکت شده اند ولی تنها با نور مرئی مشاهده می شوند. این تصویر شکل ظاهری سلول های HEK 293T را پس از ترانسفکت نشان می دهد.



شکل 4-3- نشان دهنده سلول های نشان داده شده در شکل قبل می باشد. در این شکل به جای نور مرئی از نور فرابنفش برای مشاهده سلول ها استفاده شده است و همچنین از فیلتر رنگ مناسب استفاده گردیده است تا سلول ها در صورت داشتن پروتئین GFP به رنگ سبز دیده شوند. همانگونه که مشاهده می شود سلول ها در اثر ترانسفکت با وکتور pLentiIII در این شکل به رنگ سبز دیده می شوند که نشان دهنده موفقیت آمیز بودن آزمایش ترانسفکت می باشد.

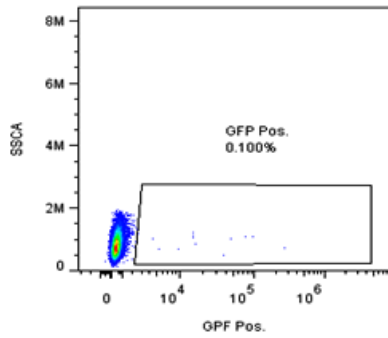


شکل 4-4- نشان دهنده سلول های HEK 293T از همان نمای اشکال فوق الذکر می باشد. در این شکل سلول ها هم با نور مرئی و هم با نور فرابنفش دیده می شوند. از این شکل می توان به درصد سلول های ترانسفکت شده پی برد و همانگونه که از شکل پیداست تقریباً تمامی سلول ها در این گروه ترانسفکت شده و رنگ سبز پیدا کرده اند.



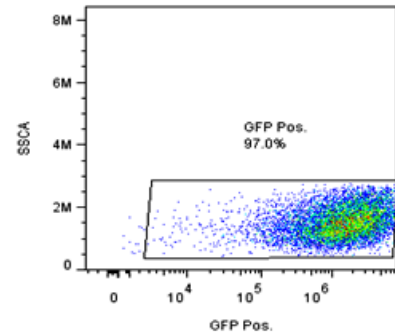
3-4- نتایج تعیین تیترو ویروس

پس از تولید و تغلیظ ویروس، تیترو ویروس تولید شده با استفاده از فلوسایتومتری تعیین شد.
(شکل 4-5)



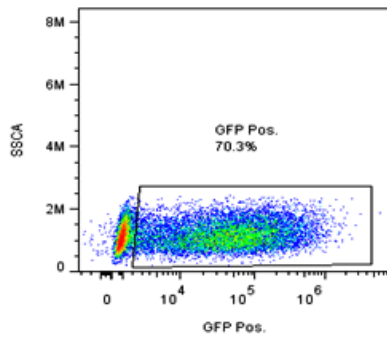
Specimen test1 (26).fcs
cells
15018

Number 1



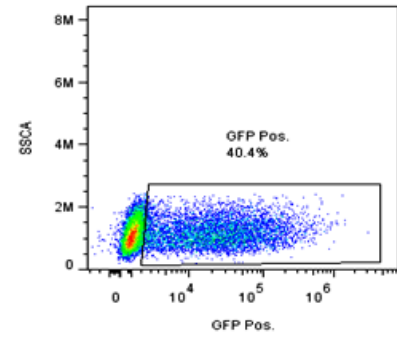
Specimen test1 (12).fcs
cells
9150

Number 2



Specimen test1 (4).fcs
cells
16652

Number 3



Specimen test1 (2).fcs
cells
16165

Number 4

شکل 4-5 نتایج مربوط به بررسی میزان بیان GFP سلول های تیمار و کنترل جهت بررسی میزان پارتیکل ویروسی تولید شده. تصویر 1 نشان دهنده سلول های کنترل است و تصاویر دیگر نشان دهنده غلظت های متفاوت بیان GFP سلول های تیمار می باشند.

جدول 1-4 میزان پارتیکل های ویروس محاسبه شده هر پلیت سلول که با توجه به نتایج فلوسایتومتری محاسبه شده است.

شماره پلیت	Virus (Particle/ml)
1	5200000
2	6000000
3	6800000

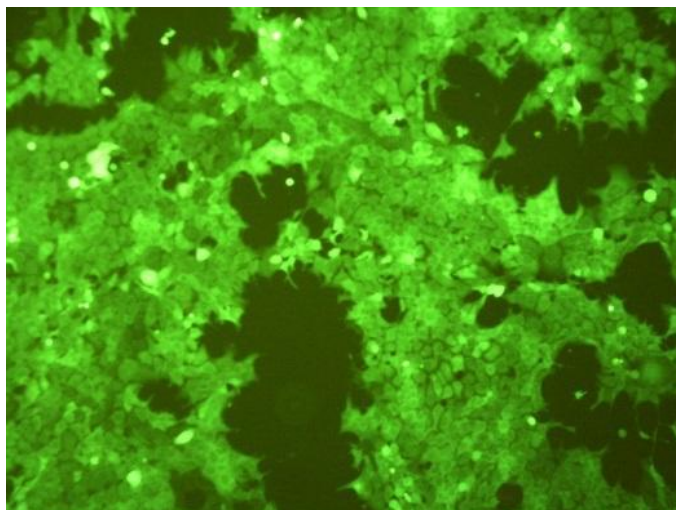
4-4 نتایج ترانسداکت سلول های Neural progenitor stem cell جهت بیان ژن miR-184 و تمایز به سمت سلول های الیگودندروسیت

پس از ساخته شدن ویروس های لازم برای انجام پروژه سلول های NPSC با استفاده از این سلول ها ترانسداکت (آلوده کردن با ویروس) شدند.

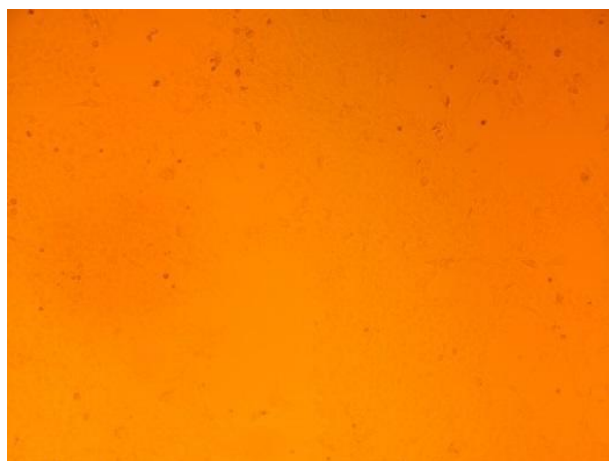
این کار در دو گروه صورت پذیرفت که در گروه اول سلول های NPSC با ویروس های حاوی ژن کد کننده miR-184 ترانسداکت شدند. این گروه در واقع گروه اصلی می باشد و نتایج آنالیزهایی که روی این گروه (البته در مقایسه با گروه کنترل) صورت می گیرد نشان دهنده تأثیر یا عدم تأثیر ژن miR-184 در میزان تمایز سلول های NPSC خواهد بود.

گروه دوم با هیچ ویروسی تیمار نشد و در واقع به جای محیط حاوی ویروس تنها محیط کشت معمولی که برای کشت سلول های NPSC استفاده می گردد و حاوی 10٪ FBS می باشد، روی سلول ها اضافه گردید.

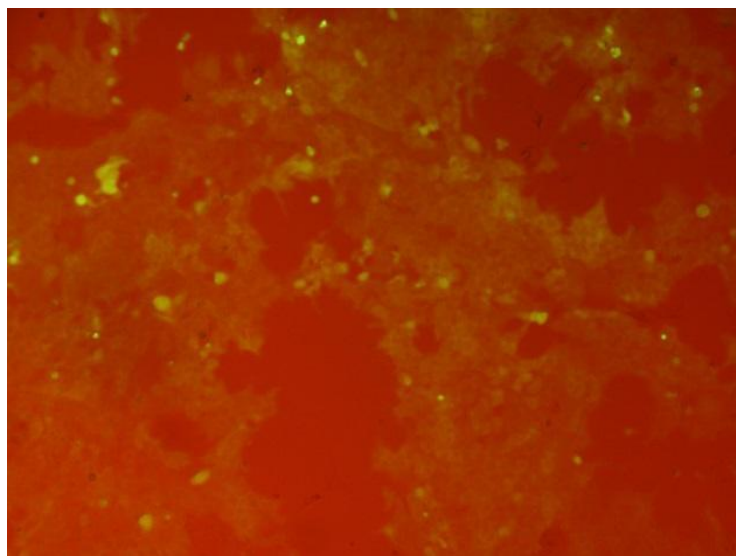
شکل 4-6 نشان دهنده سلول های ترانسداکت شده با ویروس های حاوی ژن miR-184 می باشد که زیر فیلتر سبز رنگ میکروسکوپ فلورسنت دیده می شود.



شکل 4-7- نیز همان سلول ها را زیر نور مرئی نشان می دهد.



شکل 4-8 نیز همان سلول ها زیر هر دو نور مرئی و فرابنفش را نشان می دهد. با استفاده از این شکل می توان به درصد سلول های ترانسداکت شده پی برد. با توجه به طراحی آزمایش صورت گرفته عکس ها پس از 48 ساعت از تیمار سلول های NPSC که به تعداد 30 هزار سلول در کف پلیت 48 خانه کاشته شده و همزمان با ویروس تیمار شده بودند گرفته شده اند.



هم چنین در این آزمایش 48 ساعت پس از ترانسداکشن، سلول های ترانسداکت شده را تحت تأثیر آنتی بیوتیک پورومایسین قرار داده و برای مدت زمان 3 تا 5 روز سلول ها را با این آنتی بیوتیک انکوبه می کنیم. این کار برای مطمئن شدن از ترانسداکشن سلول ها بوده و اینکه رنگ سبز دیده شده زیر میکروسکوپ فقط به دلیل ترانسداکشن سلول ها بوده و حقیقی است.

4-5- نتیجه آنالیز Real-time PCR روی نمونه های ترانسداکت شده

پس از گذشت 7 روز از انجام ترانسداکشن (ورود ویروس به درون سلول) سلول های NPSC با ویروس های مربوطه (دو گروه ژن miR-184 و کنترل) سلول ها از کف پلیت با تریپسین کنده شده و از آن ها استخراج RNA انجام گرفت. با توجه به اندازه RNA ها و جهت استخراج تمامی RNA های موجود در نمونه از پروتکل استخراج total RNA که در بخش 3-3-15 مواد و روش ها به آن اشاره گردیده است، استفاده شد.

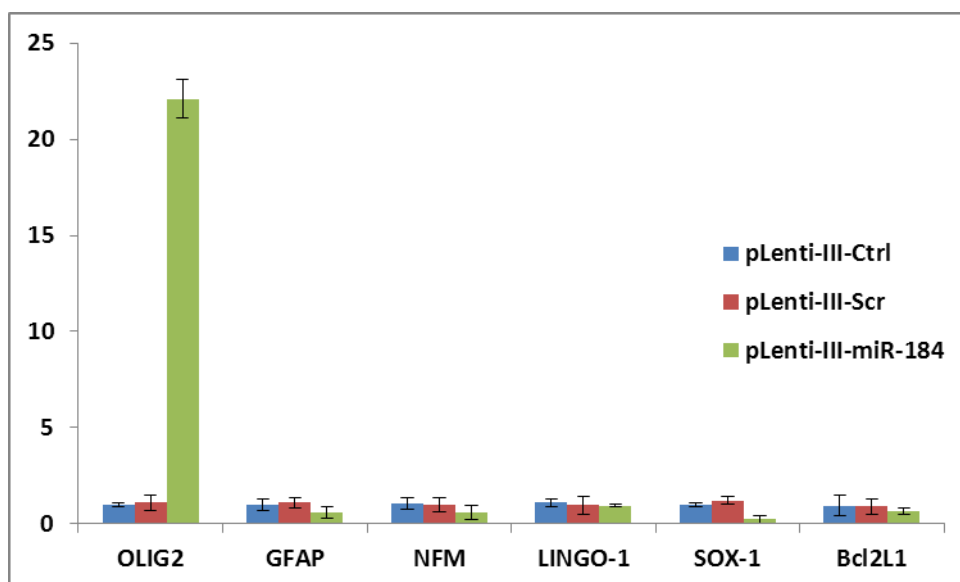
پس از این با انجام عمل cDNA سازی، RNA های استخراج شده تبدیل به DNA شدند. جهت انجام واکنش cDNA سازی به میزان 5 میکروگرم از RNA استخراج شده از سلول های NPSC ترانسداکت شده استفاده گردید.

در مرحله بعد روی cDNA های ساخته شده آنالیز Real-time PCR صورت گرفت. با استفاده از روش Real-time PCR می توان میزان بیان ژن miR-184 را اندازه گیری کرد. آنالیز Real-time PCR در دمای تشکیل ساختارهای 60 درجه سانتی گراد و در 40 سیکل صورت پذیرفت. هم چنین برای هر جفت پرایمر دو نمونه کنترل منفی نیز در هر واکنش تهیه شد که این نمونه ها که هیچ cDNA ای به آن ها افزوده نمی شود نباید در آنالیز ها پیک بدهند و در صورت وجود هر گونه پیک این موضوع باید مربوط به هیبرید خود RNA ها باشد که همان primer dimer نامیده می شود. در

صورتی که این نمونه ها نور فلورسنت داشته باشند و آنالیز های دمای تشکیل ساختارها نیز تفاوتی نشان دهد نشان دهنده آلودگی کار بوده و نتایج قابل آنالیز نخواهند بود.

پارامتر مهم در آنالیز داده های Real-time PCR، پارامتری به نام سیکل آستانه¹ می باشد. این آستانه سیکلی را نشان می دهد که در آن تمامی نمونه ها در آن آنالیز وارد فاز لگاریتمی شده اند و در حالت ایده آل که پرایمر کارایی بهینه دارد در هر مرحله محصولات PCR دو برابر می شود. پس از تعیین خط آستانه مؤلفه طول محل برخورد این خط با هر کدام از نمودارهای فلورسنسی بیانگر سیکل مربوطه خواهد بود. این مرحله از آنالیز داده های Real-time PCR در برنامه Rotor Gene 6000 انجام شد. پس از اخذ داده های مربوط به سیکل آستانه این داده ها برای آنالیز میزان بیان و بررسی های آماری وارد برنامه REST 2009² شدند. این برنامه محصولی از شرکت QIAGEN بوده و برای آنالیز داده های حاصل از Real-time PCR به کار می رود.

با توجه به داده های این قسمت، بیان ژن miR-184 در گروهی که با ویروس های حاوی ژن miR-184 تیمار شده بودند به طرز قابل توجهی نسبت به گروه بک بون بالاتر بوده است. بنابر این مطلب می توان آنالیزهای بعدی که جهت بررسی تأثیر این افزایش بیان روی عملکرد و تمایز سلول به کار می روند را انجام داد و به احتمال زیاد تأثیراتی که در قسمت های بعدی به آن ها اشاره خواهد گردید در اثر این افزایش بیان به وقوع پیوسته اند. برای بررسی میزان تمایز در روز 7 اثر miR-184 روی ژن های Olig2, MBP, GFAP, NFM, Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 مورد بررسی قرار گرفت.

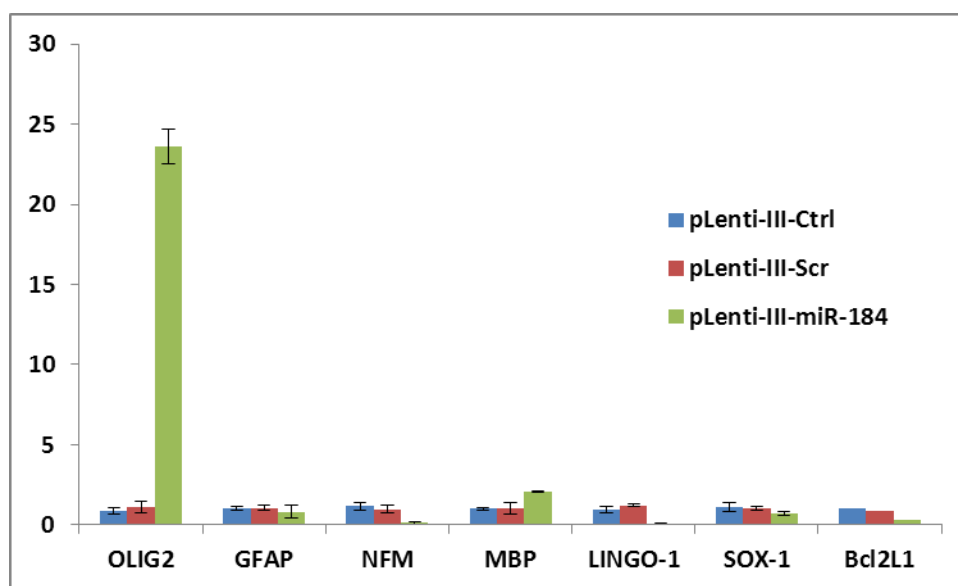


¹ Cycle of threshold (C_T)

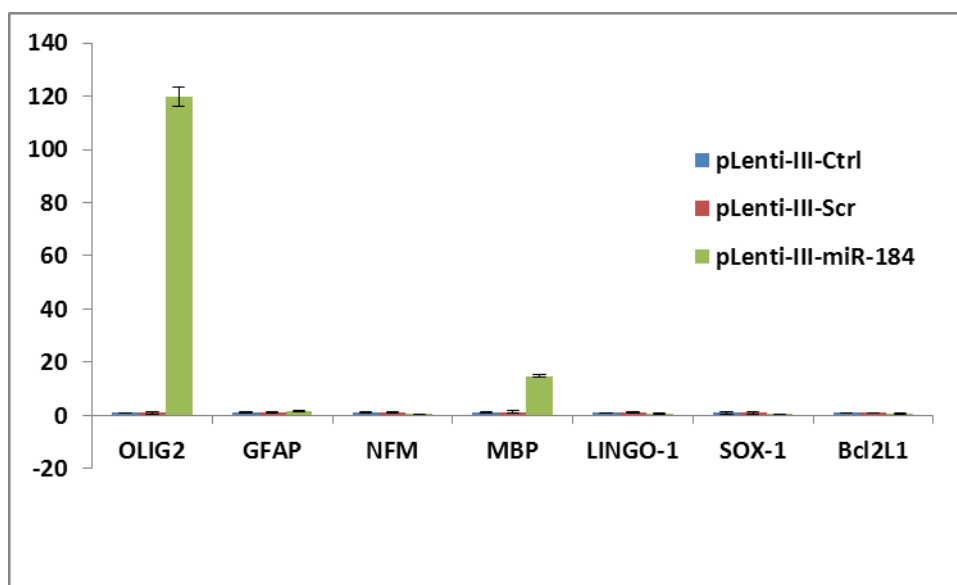
² Relative expression software tool

شکل 4-9- نتایج بررسی ژن های هدف miR-184 در هفته اول

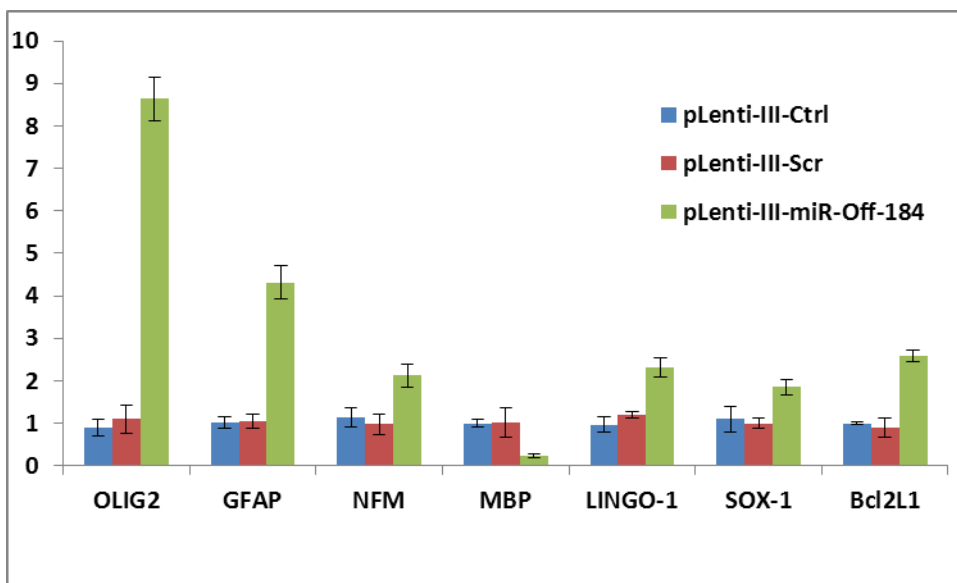
تمامی این آنالیز ها در روزهای 14 و 21 نیز تکرار شد و در هر بار میزان بیان ژن ها و miR-184 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده طبق پیش فرض های ما بودند. به این ترتیب که ژن های Olig2, MBP افزایش بیان را نشان داده و ژن های Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 که به عنوان ژن های هدف miRNA ما می باشند، کاهش بیان از خود نشان می دهند. هم چنین، ژن های GFAP, NFM که به ترتیب به عنوان ژن های اصلی مورد بررسی سلول های نورونی و آستروسیتی می باشند، کاهش بیان از خود نشان می دهند. جدول 4-6 نتایج حاصل از بررسی QRT-PCR را نشان می دهد.



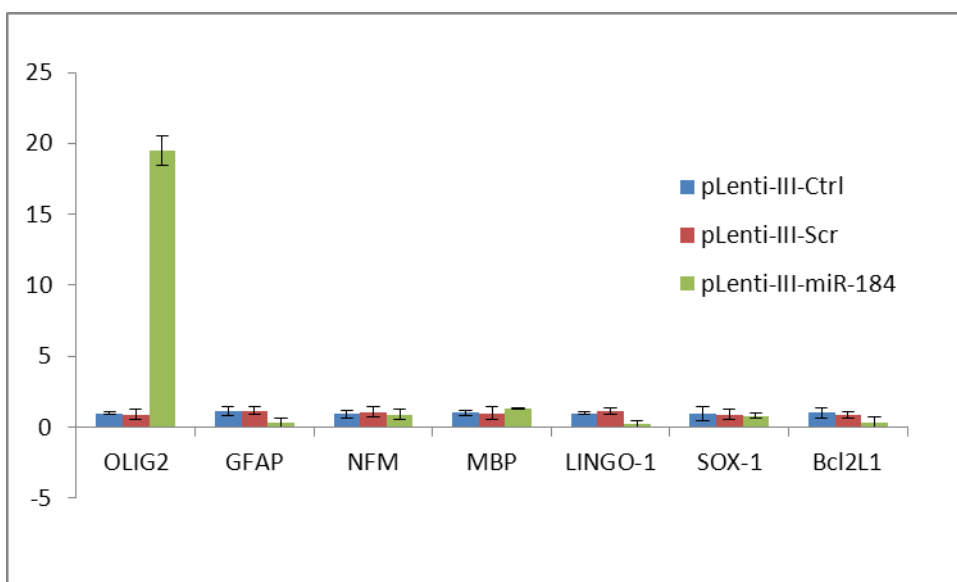
شکل 4-10- نتایج بررسی ژن های هدف miR-184 در هفته دوم



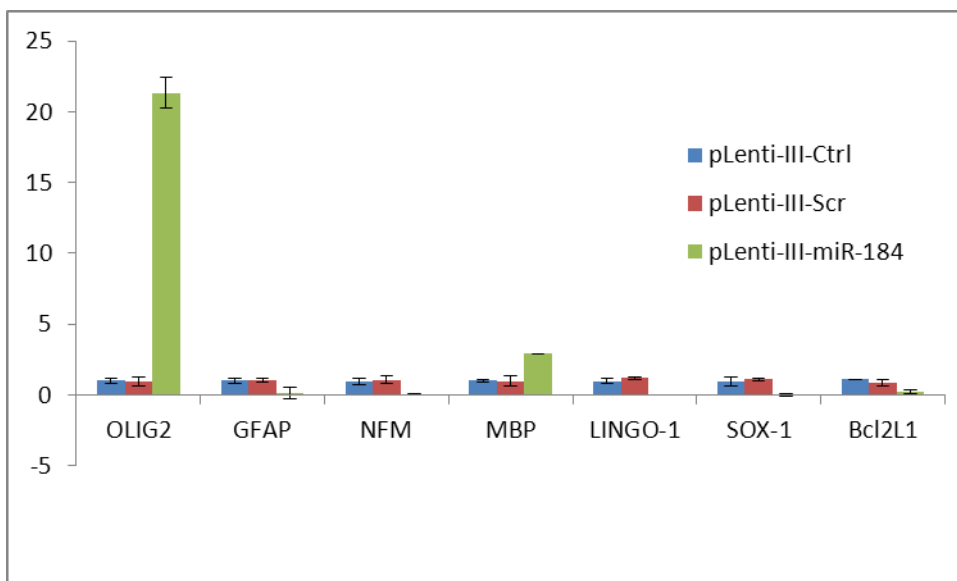
شکل 4-11- نتایج بررسی ژن های هدف miR-184 در هفته سوم
 هم چنین برای بررسی عملکرد miR-184 از محیط بدون فاکتور رشد نیز استفاده گردید و نتایج
 هفته های اول و دوم و سوم در زیر آمده است.



شکل 4-12 نتایج بررسی ژن های هدف miR-184 با محیط فاقد فاکتور رشد در هفته اول



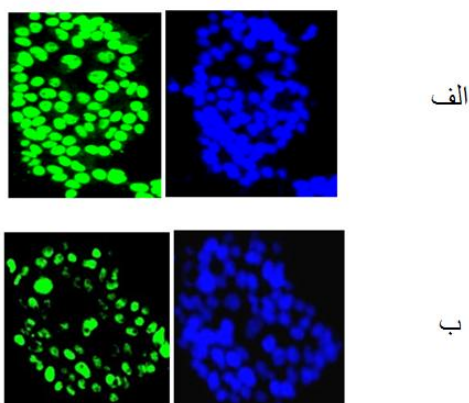
شکل 4-13 نتایج بررسی ژن های هدف miR-184 با محیط فاقد فاکتور رشد در هفته دوم



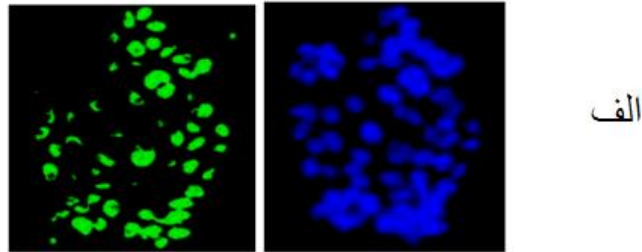
شکل 4-14 نتایج بررسی ژن های هدف miR-184 با محیط فاقد فاکتور رشد در هفته سوم

4-6- نتیجه آنالیز ICC روی نمونه های ترانسداکت شده

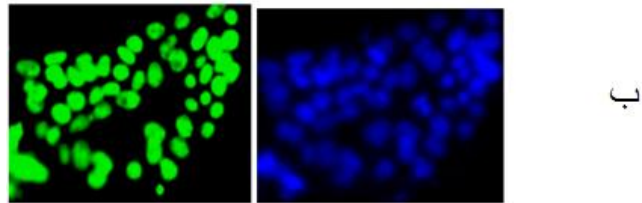
در بررسی انجام شده در روش ICC، ابتدا سلول ها روی پلیت 4خانه در روزهای 4,5,6 فیکس شدند. مراحل فیکس سلولی طبق روش ذکر شده در بخش 3-6 مواد و روش ها انجام شد. سپس سلول های فیکس شده، زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند و با مقایسه سلول های ترانسداکت شده با گروه کنترل، میزان بیان آنتی بادی های متصل به آنتی ژن های Olig-2, NKX2.2 و MBP مورد بررسی قرار گرفتند. آنتی ژن های Olig2 و Nkx2.2 از جمله آنتی ژن های بیانی در سلول های پیش ساز الیگودندروسیت ها (OPC) می باشند. آنتی ژن MBP برای بررسی تمایز الیگودندروسیتی در روز 21 استفاده شده است که تمایز نهایی را نشان می دهد .



شکل 4-15 و 4-16 به ترتیب نشان دهنده سلول های گروه ترانسداکت شده و سلول های کنترل در روز 5 برای بیان آنتی بادی Olig2 که با فلورسنت و DAPI رنگ آمیزی شده اند.

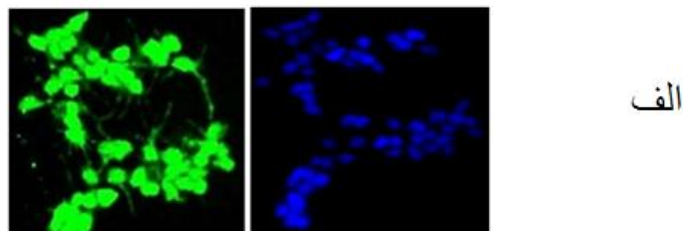


الف

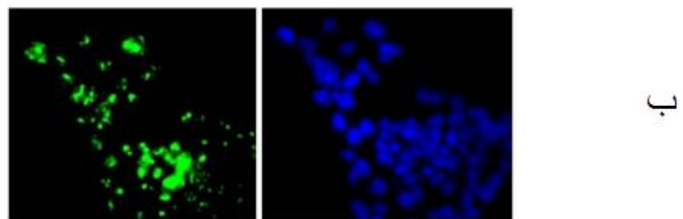


ب

شکل 4-17 و 4-18 به ترتیب نشان دهنده سلول های گروه کنترل و سلول های ترانسداکت شده برای بیان آنتی بادی NKX2.2 در روز 5 هستند.



الف



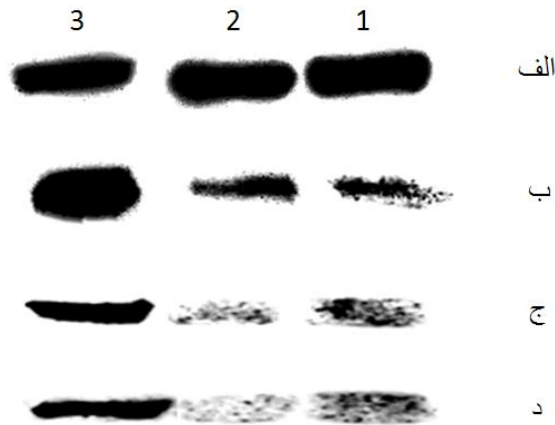
ب

شکل 4-19 و 4-20 به ترتیب نشان دهنده سلول های گروه ترانسداکت شده و سلول های کنترل برای بیان آنتی بادی MBP در روز 21 هستند.

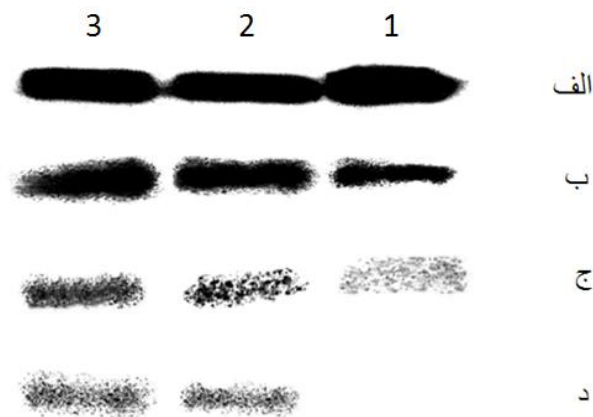
4-7- نتایج وسترن بلائینگ سلول های Neural progenitor stem cell

برای تأیید بیش تر از تأثیر miR-184 روی سلول های NPSC ترانسداکت شده و اثر آن بر روی ژن های مورد نظر وسترن بلائینگ روی نمونه های ترانسداکت شده و گروه کنترل در روزهای 7,14,21 نیز انجام شد.

شکل 4-21 نشان دهنده بررسی آنتی بادی Olig2 ، MBP ، Sox-1 و Bcl2L1 روی نمونه کنترل و سلول ترانسداکت می باشد.



شکل 4-21- نشان دهنده بررسی آنتی بادی Olig2 ، Nkx2.2 و MBP روی نمونه کنترل و سلول ترانسداکت شده است. (الف) چاهک اول و دوم کنترل داخلی β -actin روی نمونه های کنترل و چاهک سوم کنترل داخلی β -actin روی نمونه های ترانسداکت شده می باشد. (ب) چاهک اول و دوم نمونه کنترل و چاهک سوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 با آنتی بادی MBP می باشد. (ج) چاهک اول و دوم نمونه کنترل و چاهک سوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 با آنتی بادی Olig2 می باشد. (د) چاهک اول و دوم نمونه کنترل و چاهک سوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 با آنتی بادی Nkx2.2 می باشد.



شکل 4-22- نشان دهنده بررسی آنتی بادی های Lingo-1, Sox-1, Bcl2L1 روی نمونه کنترل و سلول ترانسداکت شده است. الف) چاهک اول و دوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 و چاهک سوم نمونه کنترل برای آنتی بادی β -actin می باشد. ب) چاهک اول و دوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 و چاهک سوم نمونه کنترل برای آنتی بادی Lingo-1 می باشد. ج) چاهک اول و دوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 و چاهک سوم نمونه کنترل برای آنتی بادی Sox-1 می باشد. د) چاهک اول و دوم نمونه ترانسداکت شده با miR-184 و چاهک سوم نمونه کنترل برای آنتی بادی Bcl2L1 می باشد.

8-4- نتایج مربوط به تهیه سازه مورد نیاز برای انجام پروژه

4-8-1- نتیجه استخراج پلاسمید psi-checkII

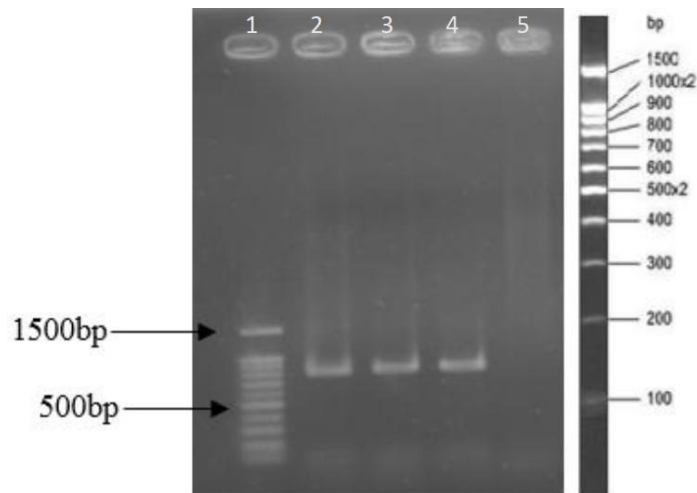
پلاسمید psi-checkII که طبق نکات ذکر شده در بخش مواد و روش ها برای انجام این پروژه و کلونینگ ژن های Sox-1, LINGO-1, Bcl2L1 انتخاب گردید ابتدا از باکتری حاوی این پلاسمید پس از کشت 16 ساعته استخراج گردید و سپس این پلاسمیدهای استخراج شده روی ژل الکتروفورز 0/8% برده شد تا بررسی شود که پلاسمید به درستی استخراج شده است. از طرف دیگر این ژل نشان دهنده میزان غلظت پلاسمید استخراج شده نیز بود.

4-8-2- نتیجه واکنش PCR برای تکثیر ژن های Sox-1, LINGO-1, Bcl2L1

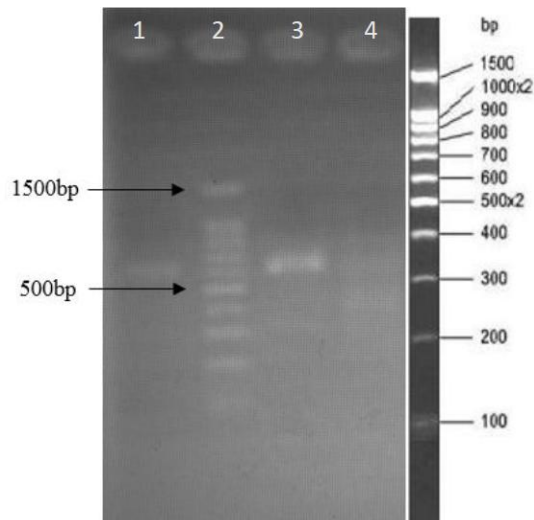
با استفاده از پرایمرهای کلونینگ که در بخش مواد و روش ها به آن ها اشاره گردید از روی DNA ژنومیک قطعه مورد نظرمان (ژن های Sox-1, LINGO-1, Bcl2L1) تکثیر گردیدند. با توجه به اینکه این ژن ها به ترتیب طولی برابر با 600, 900, 1600 جفت باز دارد انتظار داریم روی ژل پس از انجام الکتروفورز ژل آگارز نیز در مقایسه با نردبان طول، قطعه ای که مشاهده می شود طولی برابر با این تعداد باز داشته باشد.

از طرف دیگر توجه به توالی استفاده شده در پرایمرها نیز ضروری می باشد. با توجه به این نکته که قرار است ژن های Sox-1, LINGO-1, Bcl2L1 کلون شده بعداً در وکتور psi-checkII کلون گردد و این کار با استفاده از جایگاه های برش دهنده آنزیم های محدود کننده XhoI و NotI صورت خواهد پذیرفت بنابراین توالی هایی که این آنزیم ها شناسایی می کنند در سمت 5' توالی های پرایمرها قرار داده شده اند.

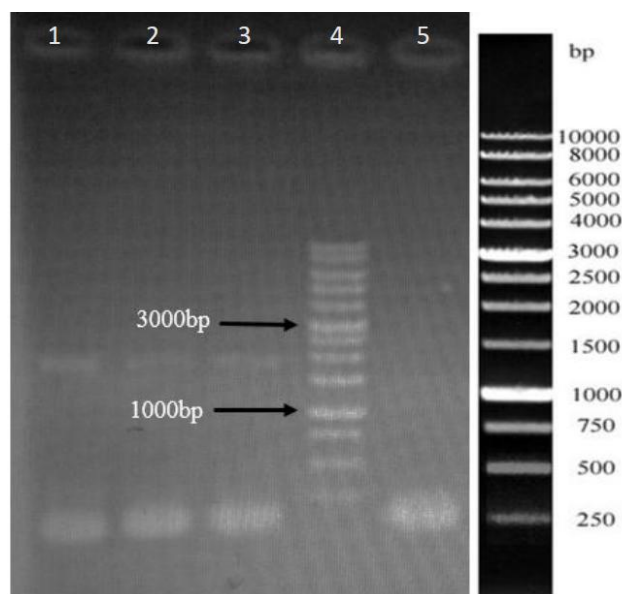
بعد از انجام PCR به تعداد 35 سیکل با استفاده از پروتکل ذکر شده در بخش مواد و روش ها محصول PCR روی ژل الکتروفورز آگارز برده شد. نتایج حاصل از این آنالیز نشان دهنده درست بودن کلونینگ ژن ها توسط واکنش PCR می باشد و تأیید کننده سائز قطعه های سنتز کننده نیز می باشد.



شکل 4-23- انجام PCR ژن LINGO-1: چاهک اول نردبان ژنی 100bp خریداری شده از شرکت BioRon، چاهک دوم، سوم و چهارم نمونه PCR شده از ژن LINGO-1 با باند 900bp و چاهک پنجم کنترل منفی



شکل 4-24- انجام PCR روی Bcl2L1 چاهک اول و سوم نمونه PCR شده روی ژن Bcl2L1، چاهک دوم نردبان ژنی 100bp خریداری شده از شرکت BioRon و چاهک چهارم کنترل منفی

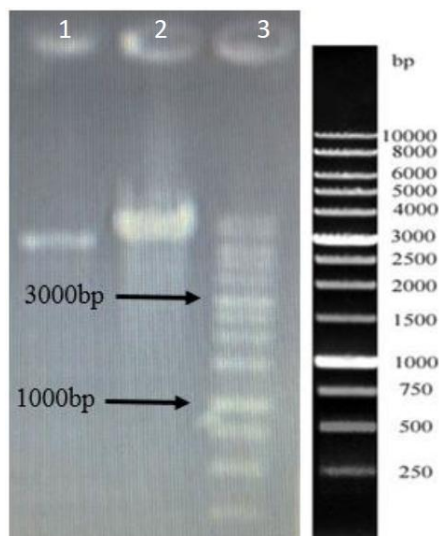


شکل 4-25: انجام PCR روی Sox-1 چاهک اول و دوم و سوم نمونه های PCR شده روی ژن Sox-1 چاهک چهارم نردبان ژنی 1kb خریداری شده از شرکت BioRon و چاهک پنجم کنترل منفی

4-3-8 نتیجه هضم وکتور با آنزیم های محدود کننده XhoI و NotI

جهت انجام کلونینگ ژن های Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 در پلاسمید استخراج شده psi-checkII ابتدا باید این وکتور با آنزیم های محدود کننده مناسب بریده شود. با توجه به طراحی انجام گرفته این کار با استفاده از آنزیم های محدود کننده XhoI و NotI صورت می پذیرد. با توجه به این مطلب وکتور psi-checkII با استفاده از این آنزیم ها بریده شده و سپس روی ژل الکتروفورز آگارز آنالیز گردید. این کار بدین منظور انجام گرفت تا هم غلظت وکتور پس از انجام عمل هضم آنزیمی مشاهده گردد و هم بریده شدن وکتور با استفاده از این آنزیم ها تأیید شود، زیرا در صورتی که هر کدام از این آنزیم ها نتوانند وکتور مورد نظر را هضم کرده و برش دهند با توجه به عدم وجود جایگاه چسبنده مناسب برای اتصال با محصول PCR بریده شده با این آنزیم ها، امکان انجام واکنش اتصال توسط آنزیم لیگاز وجود نخواهد داشت و عمل کلونینگ با موفقیت صورت نخواهد پذیرفت.

شکل 4-26- شکل وکتور psi-checkII بریده شده توسط آنزیم های XhoI و NotI را که پس از انجام هضم و غیرفعال کردن آنزیم های محدود کننده روی ژل الکتروفورز برده شد، نشان می دهد. این وکتور همانگونه که در شکل نیز دیده می شود طولی برابر 6273 جفت باز دارد.



شکل 4-26- پلاسمید psi-checkII چاهک اول پلاسمید هضم شده، چاهک دوم پلاسمید هضم نشده و چاهک سوم نردبان ژنی 1kb خریداری شده از شرکت BioRon

پس از انجام ژل الکتروفورز، وکتور psi-checkII با ژن های کلون شده Bcl2L1, LINGO-1, ligate Sox-1 شدند. باکتری DH5 α برای مدت 16 ساعت کشت شبانه روزی داده شد و سپس در صبح انجام عمل ترانسفورم، از باکتری های کشت داده شده برای مدت 2 ساعت کشت مجدد داده شد. باکتری ها طبق روش گفته شده در بخش 3-3-5 مواد و روش ها ترانسفورم شد و باکتری ها روی پلیت جامد LB-Agar کشت داده شدند.

4-8-4 نتیجه کلونی PCR بعد از ترانسفورماسیون وکتور کلون شده psi-checkII/Bcl2L1, psi-checkII/LINGO-1, psi-checkII/Sox-1

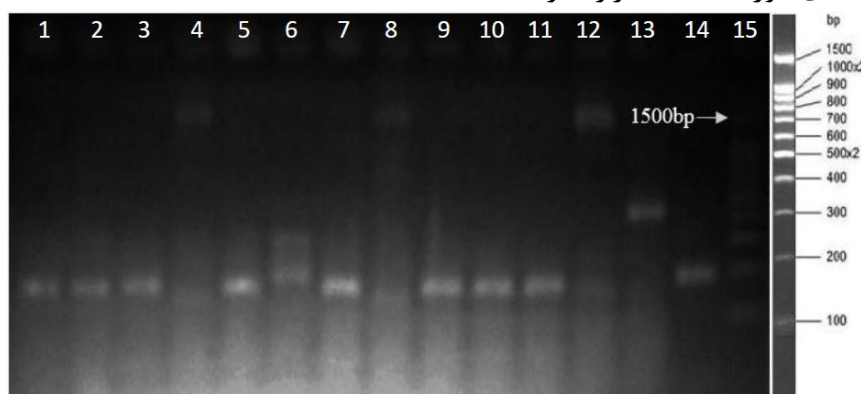
این مرحله از آزمون های تأیید کلونینگ معمولاً روز بعد از انجام ترانسفورماسیون انجام می گیرد. این آنالیز با توجه به تعداد زیاد کلونی های رشد کرده روی پلیت صورت می پذیرد تا با یک آنالیز اولیه کلونی هایی که به نظر مثبت می آیند و هم روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک رشد کرده اند و هم در PCR آن ها باند مورد نظر روی ژل آگارز دیده می شود انتخاب شوند و برای آنالیزهای بعدی و تأیید نهایی آماده شوند.

برای انجام این مرحله، از پرایمرهای خود ژن Bcl2L1 که برای کلونینگ استفاده شده بود استفاده گردید. اما برای ژن های LINGO-1, Sox-1 از پرایمرهای طراحی شده روی وکتور که در قبل و بعد از ناحیه آنزیم های محدودکننده قرار گرفته اند، استفاده گردید. پس از انجام PCR محصول واکنش روی ژل الکتروفورز آگارز برده شد. کلونی هایی که در الکتروفورز آن ها با توجه به پرایمرهای استفاده شده باند مورد نظر 600,900,1600 جفت بازی دیده شود، به عنوان کلونی مثبت انتخاب می گردد و احتمال زیادی هست که عمل کلونینگ در آن ها به درستی صورت گرفته است.

البته توجه به این نکته ضروری می باشد که لزوماً تمامی کلونی هایی که در این مرحله از آزمون مثبت می شوند در مراحل بعدی نیز مثبت نخواهند بود و کلونی PCR می تواند نتایج مثبت نادرست

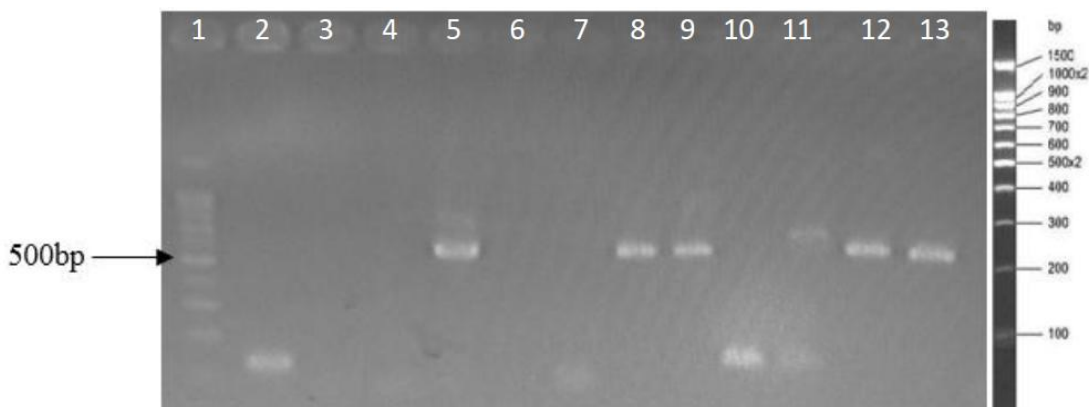
نیز داشته باشد. این مورد به دلیل وجود قطعات DNA وارد باکتری نشده روی باکتری یا وجود قطعه‌هایی از ژن که عمل اتصال آنزیمی در آن‌ها صورت نگرفته است می‌تواند باشد، ولی به هر صورت این روش یک روش سریع و ارزان قیمت برای یافتن کلونی‌هایی که با احتمال زیاد کلونینگ در آن‌ها صورت پذیرفته است، می‌باشد.

شکل‌های زیر نتیجه آنالیز کلونی PCR روی کلونی‌های رشد کرده روی پلیت آمپی سیلین پس از انجام ترانسفورماسیون وکتور کلون شده ψ -checkII/Bcl2L1, ψ -checkII/LINGO-1, ψ -checkII/Sox-1 در باکتری DH5 α را نشان می‌دهند. همانگونه که از شکل نیز پیداست، کلونی‌هایی که واکنش‌های کلونی PCR نتیجه مثبت داده‌اند (باند مورد نظر در آن‌ها دیده می‌شود)، می‌توانند برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گیرند.



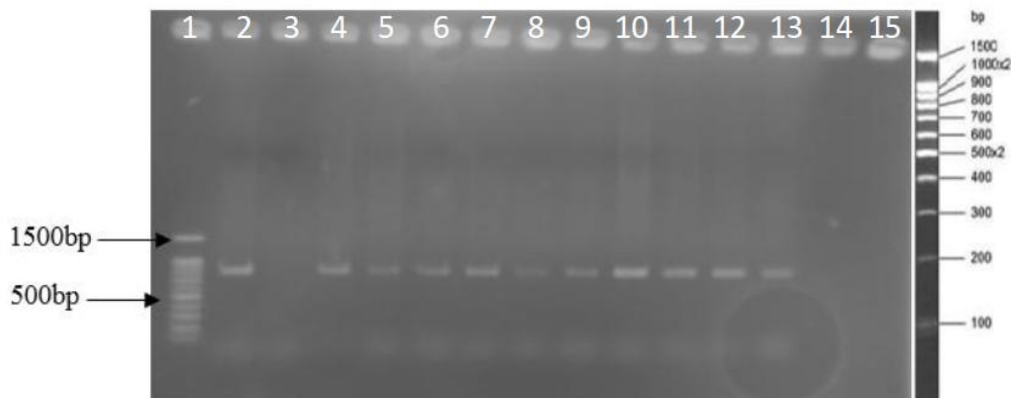
شکل 4-27- انجام کلونی PCR روی کلون‌های Sox-1، چاهک 4 و 8 و 12 کلون مثبت از کلونینگ ژن Sox-1 و چاهک های 1 و 2 و 3 و 5 و 6 و 7 و 9 و 10 و 11 و 13 و 14 کلون منفی این کلونینگ می‌باشند. چاهک 15 چپ نردبان ژنی 1kb

شرکت BIORON



شکل 4-28- انجام کلونی PCR روی کلون‌های Bcl2L1، چاهک 5 و 8 و 9 و 11 و 12 و 13 کلون مثبت از کلونینگ Bcl2L1 و چاهک 2 و 3 و 4 و 6 و 7 و 10 کلون منفی این کلونینگ میباشند. چاهک 1 از چپ نردبان ژنی 100bp شرکت

BIORON



شکل 4-29- انجام کلونی PCR روی کلون های LINGO-1، چاهک های 2 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 و 11 و 12 و 13 کلون مثبت از کلونینگ ژن LINGO-1 می باشند و چاهک های 3 و 14 و 15 کلون منفی از این کلونینگ. چاهک اول نردبان ژنی 100bp خریداری شده از شرکت BioRon

4-8-5- نتیجه هضم آنزیمی روی پلاسمیدهای استخراج شده برای تأیید وجود ژن مورد نظر

پس از کشت و استخراج پلاسمید از کلونی های انتخاب شده در مرحله کلونی PCR، پلاسمیدهای استخراج شده دوباره با همان آنزیم های محدود کننده که برای کلونینگ از آن ها استفاده شده بود هضم گردیده و بریده شدند. این کار مرحله دوم از آزمون های تأیید کلونینگ صحیح می باشد. در صورتی که کلونینگ به درستی صورت گرفته باشد باید قطعه ژن مورد نظر در بین جایگاه های برش در روی وکتور قرار گرفته باشد و همچنین در صورت بردن پلاسمید روی ژل آگارز قطعه 600,900,1600 جفت بازی Sox-1, LINGO-1, Bcl2L1 روی ژل دیده شود.

با توجه به این مطالب پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از آنزیم های محدود کننده XhoI و NotI بریده شدند و سپس نتیجه واکنش هضم آنزیمی روی ژل الکتروفورز آگارز برده شد تا وجود یا عدم وجود باند مورد نظر بررسی گردد. در صورت وجود باند مطلوب روی ژل می فهمیم که عمل کلونینگ به درستی صورت گرفته است و قطعه های ژنی مورد نظرمان (Sox-1, LINGO-1, Bcl2L1) درون وکتور مورد نظر (در این جا وکتور psi-checkII) در جایگاه مناسب کلون شده است. اما در صورتی که باند مورد نظر دیده نشود نشانگر این است که عمل کلونینگ به درستی صورت نگرفته و عمل ترانسفورماسیون باید مجدداً انجام شود یا اینکه از مابقی کلونی هایی که روی پلیت رشد کرده بودند، استفاده گردد.

9-4- نتایج ترانسفکت سلول های HEK 293T با استفاده از پلاسمید psi-checkII/Bcl2L1, psi-checkII/LINGO-1, psi-checkII/Sox-1 با روش

لیپوفکتامین

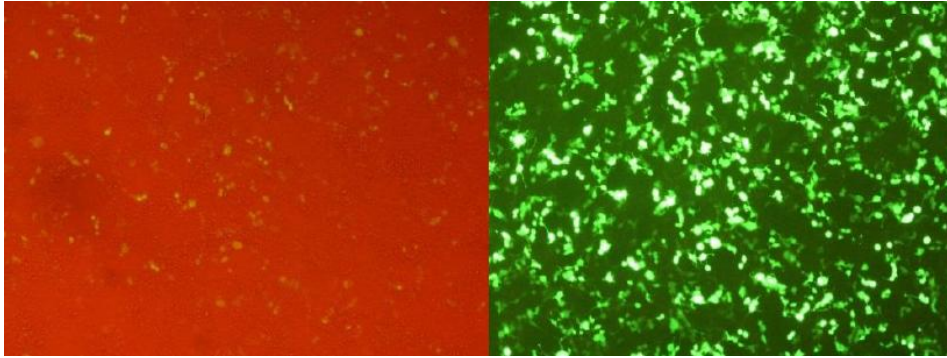
آزمایش ترانسفکت سلول های HEK 293T با وکتورهای psi-checkII/Bcl2L1, psi-checkII/LINGO-1, psi-checkII/Sox-1 به همراه وکتور pLentiIII-miR-184 در صورت عملکرد صحیح با توجه به وجود ژن کد کننده پروتئین GFP در وکتور pLentiIII-miR-184، باید همراه با سبز رنگ شدن سلول هایی که وکتور به درون آن ها راه یافته است، باشد. این موضوع به این دلیل می باشد که پروتئین فلورسنت سبز در زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز دیده می شود.

ترانسفکت سلول ها در دو گروه تیمار با وکتور psi-checkII/Bcl2L1, psi-checkII/LINGO-1, psi-checkII/Sox-1 و کنترل انجام گرفت. گروه تیمار اول که همان وکتورهای نوترکیبی است که در جریان این پروژه ساخته شده اند و حاوی ژن های کد کننده Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 می باشند. در گروه کنترل عمل ترانسفکت با استفاده از لیپوفکتامین صورت می پذیرد و هیچ وکتوری به محیط کشت سلول های HEK 293T افزوده نمی گردد.

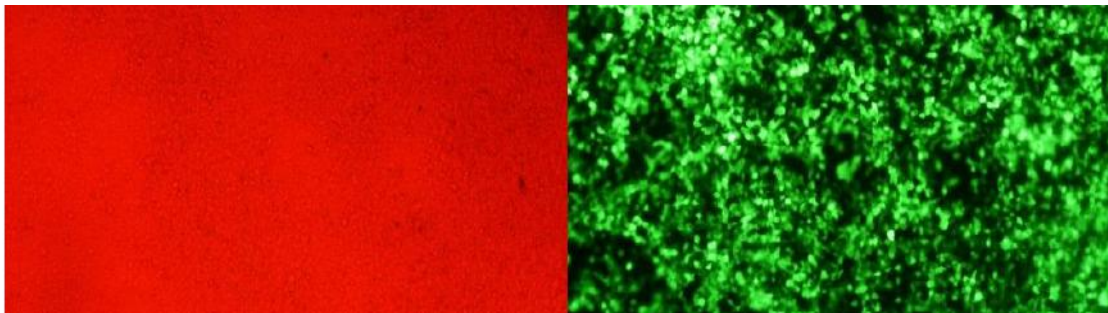
این وکتور حاوی دو ژن کدکننده فلورسنت است که ژن Synthetic Renilla luciferase(hRluc) تحت پروموتور T7 و ژن Synthetic firefly luciferase(hluc) تحت پروموتور HSV-TK می باشد. به همین دلیل است که نام این وکتور psi-checkII می باشد. اگر ژن مورد نظر ما در این وکتور به درستی کلون شود، قبل از پروموتور HSV-TK قرار می گیرد و اگر این ژن، هدف miR-184 باشد، miR-184 به ژن متصل شده و بنابراین سبب جلوگیری از بیان ژن hluc می شود.

در گروه تیمار علاوه بر اضافه کردن وکتور حاوی ژن های مورد نظر، پلاسمید pLentiIII-miR-184 نیز اضافه می شود تا نحوه اثر miR-184 روی ژن های مورد نظر بررسی شود.

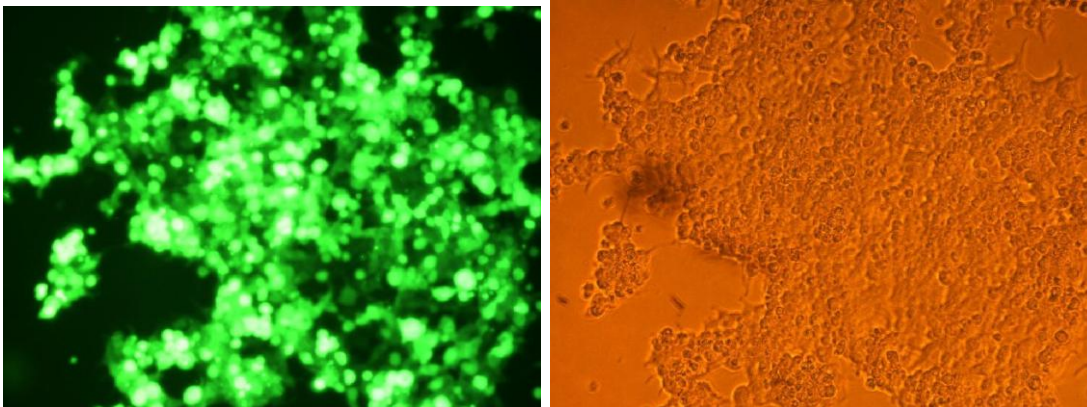
شکل 4-30 نشان دهنده سلول های HEK 293T زیر میکروسکوپ فلورسنت می باشد. در این شکل سلول ها با وکتور psi-checkII/Bcl2L1 و pLentiIII-miR-184 ترانسفکت شده اند که با نور فلورسنت و مرئی به صورت هم زمان و نور فلورسنت مشاهده می شوند. این تصویر شکل ظاهری سلول های HEK 293T را پس از ترانسفکت نشان می دهد.



شکل 4-30- نشان دهنده سلول های HEK 293T زیر میکروسکوپ فلورسنت می باشد. در این شکل سلول ها با وکتور psi-checkII/LINGO-1 و pLentiIII-miR-184 ترانسفکت شده اند که با نور فلورسنت و مرئی به صورت هم زمان و نور فلورسنت مشاهده می شوند. این تصویر شکل ظاهری سلول های HEK 293T را پس از ترانسفکت نشان می دهد.



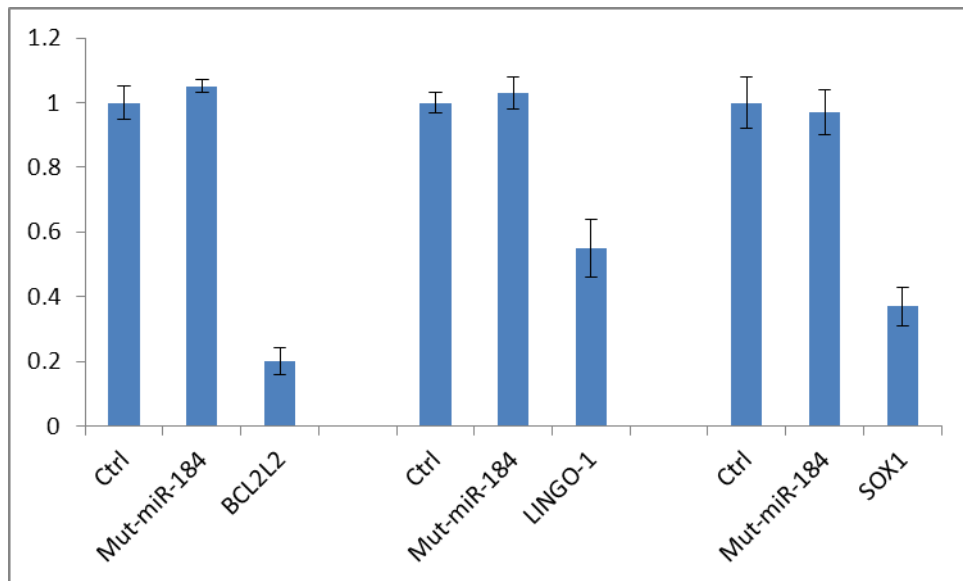
شکل 4-31- نشان دهنده سلول های HEK 293T زیر میکروسکوپ فلورسنت می باشد. در این شکل سلول ها با وکتور psi-checkII/Sox-1 و pLentiIII-miR-184 ترانسفکت شده اند و با نور فلورسنت مشاهده می شوند. این تصویر شکل ظاهری سلول های HEK 293T را پس از ترانسفکت نشان می دهد.



10-4- نتایج لوسیفراز ژن های Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 روی سلول HEK-T293

در آنالیز لوسیفراز ژن های Bcl2L1, LINGO-1, Sox-1 کلون شده در وکتور psi-checkII که سلول های HEK-T293 با آن ها ترانسفکت شده اند، طبق روش گفته شده در بخش 5-3 مواد و روش ها مورد بررسی قرار می گیرند. اعداد به دست آمده در این آنالیز، طبق فرمول به هم تقسیم شده و عدد نهایی به دست آمده میزان کاهش بیان ژن ها را نشان می دهد.

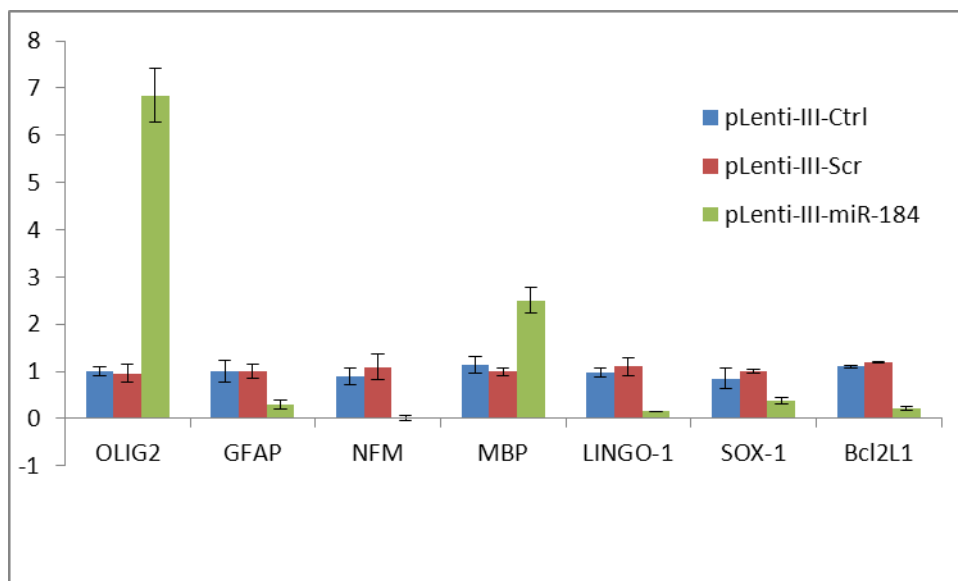
به این ترتیب که عدد به دست آمده از Renilla را به عدد به دست آمده از Firefly تقسیم می کنیم. (عدد دوم تقسیم بر عدد اول) و نتیجه به دست آمده را با کنترل مقایسه می کنیم. نتایج لوسیفراز در زیر مشاهده می شود. در این آنالیز نشان داده شد که ژن Bcl2L1 میزان 80٪ کاهش بیان، ژن LINGO-1 میزان 45٪ کاهش بیان و ژن Sox-1 میزان 63٪ کاهش بیان داشتند. در این آنالیز برای بررسی میزان کاهش بیان از 3 نمونه استفاده شد و نهایتاً میانگین نتایج به دست آمده در نظر گرفته شد.



شکل 4-32 بررسی نتایج لوسیفراز روی ژن Bcl2L1، LINGO-1 و Sox-1

4-11- نتایج آزمایشات روی موجود زنده:

در این پروژه برای بررسی تأثیر miR-184 در موجودات زنده نیز آزمایش هایی انجام شد. در این آزمایش ها مشاهده شد که miR-184 با همان اثری که روی بیان ژن ها در حالت *in vitro*، ژن های مورد نظر را در موجود زنده تحت تأثیر قرار داده است. نتایج RT-PCR در جدول زیر مشخص شده است.



شکل 4-33- نتایج RT-PCR روی مغز جنین موش

فصل پنجم

بحث، نتایج و پیشنهادات

در دنیای امروز علت بروز، علائم و درمان بیماری های خودایمنی از جمله موضوعاتی هستند که ذهن دانشمندان را درگیر کرده اند. بیماری خودایمنی هنگامی رخ می دهد که دستگاه ایمنی بدن به اشتباه حمله به خود بدن را آغاز می کند. تاکنون ۸۰ نوع از بیماری های خود ایمن شناسایی شده است که طیف وسیعی از بافت ها و سلول های بدن را در بر می گیرد. مطالعات نشان داده اند که بیماری های خودایمنی زنان را بیشتر از مردان گرفتار می کنند. هم چنین مشخص شده است که این دسته از بیماری ها زمینه ارثی دارند. بروز علائم در این بیماری ها به صورت رفت و برگشتی بوده، به این ترتیب که ممکن است بیمار مدتی هیچ علامتی نداشته باشد و بعد حمله شدید و ناگهانی در بیمار رخ دهد که به آن شعله ور شدن^۱ بیماری می گویند.

این بیماری ها، بیماری های مزمنی هستند که مادام العمر با فرد باقی مانده و قابلیت درمان صد در صد ندارند. تا به امروز برای درمان این بیماری ها از داروها استفاده می کردند. البته شایان ذکر است که علاوه بر داروها، کاهش استرس هم به بهبودی علائم کمک می کند. افراد مبتلا به بیماری های خودایمنی باید عادات سالمی مانند انجام مداوم ورزش، خوردن رژیم غذایی مناسب و داشتن خواب کافی را برگزینند.

از جمله بیماری های خودایمنی که امروزه جهان را درگیر خود کرده است، بیماری مولتیپل اسکلروزیس (MS) می باشد. در این بیماری، که هنوز علت اصلی آن مشخص نشده است، سلول های ایمنی به سیستم دستگاه عصبی مرکزی حمله می کنند و غلاف میلین را دچار آسیب می کنند. غلاف میلین، غلافی است که در انتقال درست پیام عصبی نقش بسزایی دارد و لازم به ذکر است که این غلاف توسط سلول های الیگودندروسیتی تولید می شود. علاوه بر داشتن روش زندگی سالم و نیز استفاده از داروها، امروزه استفاده از سلول های بنیادی مغز استخوان یا در واقع سلول درمانی برای درمان این بیماری در رده پیشنهادات جدید قرار می گیرند. سلول های بنیادی روی محیط کشت رشد داده شده و سپس به سلول های مختلف، که می توانند در مهار یا درمان بیماری های خودایمن مورد استفاده قرار گیرند، تمایز می یابند. علت استفاده از این سلول ها ترشح موادی است که سیستم ایمنی را مهار می کند و هم چنین می توان آن ها را به سلول هایی که در اثر بیماری از بین رفته اند، تمایز داد و آن ها را جایگزین بافت آسیب دیده کرد. اخیراً مطالعات به دلایل مختلفی از جمله گران قیمت، سخت و طولانی بودن روش های درمانی ذکر شده، به سمت روش های مولکولی سوق داده شده اند (Zhao, He et al. 2010). این جهت گیری هدف مند، به دلیل مشخص شدن کاربردهای متعدد بیومولکول های غیرکدشونده در تشخیص، جلوگیری از بروز و درمان بیماری بوده است.

در این مطالعه نیز سعی بر این بوده است که با استفاده از RNA های غیرکدشونده (miRNA)، سلول های بنیادی پیش ساز سلول های عصبی (NPSCs) را به سلول های الیگودندروسیت تمایز دهیم. در واقع هدف این مطالعه پیش برد روند تمایز سلول های NPSC به سلول های الیگودندروسیتی و ترمیم بافت آسیب دیده می باشد.

¹ Flare-up

بررسی هایی که با دستگاه های با توان عملکردی بالا روی رونوشت های سلولی انجام گرفت، نشان دادند که بخش اعظم DNA ژنومی پستانداران در سلول رونویسی می شود. با توجه به روند مشاهده شده در تکامل عقلانی به نظر نمی رسد که تمامی این رونوشت ها در اثر خطا در رونویسی ایجاد شوند و با وجود اینکه برای بسیاری از آنها هنوز عملکردی مشخص نشده است ولی تعدادی از این رونوشت ها هستند که علی رغم اینکه هیچ پروتئینی از روی آنها ترجمه نمی شود ولی عملکرد آنها به روشنی تعیین شده است. این دسته از RNA ها که به پروتئین ترجمه نمی شوند و هر روز بر تعداد و عملکردهای آنان افزوده می شود را RNA های غیرکدشونده می نامند.

به طور کلی RNA های غیرکدشونده به دو دسته microRNA ها با طولی حدود 20-22 نوکلئوتید و RNA های غیرکدشونده بلند با طول بیش از 200 نوکلئوتید تقسیم می شوند. تا کنون عملکردهای مختلفی برای RNA های غیر کدکننده مختلف از جمله تغییرات اپی ژنتیک، به هم پیوستن mRNA، کنترل ترجمه و کنترل رونویسی مشخص شده است. در این پروژه از miR-184 برای انجام تمایز به سمت سلول های الیگودندروسیتی استفاده شده است.

در مسیر تمایز از سلول های NPSC، سه دسته سلول عصبی تولید می شود که عبارتند از: سلول های نورونی، سلول های آستروسیتی و سلول های الیگودندروسیتی. در مسیر تمایز به هر کدام از این سلول ها ژن هایی نقش دارند که با مهار این ژن ها می توان آن مسیر خاص را نیز مهار کرد.

در مطالعات اخیر اثر احتمالی miR-184 در درمان بیماری MS پیشنهاد شده بود (Letzen, Liu et al. 2010). در این پروژه نشان داده شد که miR-184 با اتصال به ژن Bcl2L1 نقش خود را در مسیر تمایزی الیگودندروسیتی ایفا می کند. ژن Bcl2L1 از جمله ژن های اصلی در مسیر تمایز به سمت سلول های آستروسیتی می باشد و همان طور که گفته شد با مهار تمایز به سمت سلول های آستروسیتی، مسیر تمایز الیگودندروسیتی بهبود می یابد.

در این مطالعه، با افزایش بیان miR-184 در سلول های NPSC روند تمایزی به سمت سلول های الیگودندروسیتی بهبود پیدا می کند. با توجه به اینکه هر miRNA می تواند چندین هدف mRNA یی داشته باشد، بنابراین مطالعات بیوانفورماتیکی برای بررسی هدف های miRNA موردنظر ادامه پیدا کرد.

در ادامه مطالعات بیوانفورماتیکی در این پروژه، مشخص شد که miR-184 قابلیت اتصال به ژن Sox-1 و LINGO-1 را نیز داراست. بررسی ها نشان دادند که ژن Sox-1 از جمله ژن های دخیل در روند تمایز به سمت سلول های نورونی می باشند و ژن LINGO-1 مسیر تمایز به سمت سلول های الیگودندروسیت را مهار می کنند. بنابراین با برهم کنش این miRNA با ژن های ذکر شده، به ترتیب مسیر تمایز نورونی مهار شده و مهار ایجاد شده توسط ژن LINGO-1 در مسیر تمایز الیگودندروسیتی از بین می رود و این خود به بهبود عملکرد روند تمایز الیگودندروسیتی کمک می کند.

پیش از این نقش miR-338 و miR-219 در روند تمایز مورد مطالعه قرار گرفته بودند و در این مطالعات مشخص شده بود که این miRNA ها نقش اساسی در روند تمایزی الیگودندروسیتی

دارند (Zhao, He et al. 2010). این مطالعه اولین مطالعه ای است که به بررسی نقش miR-184 در روند تمایز الیگودندروسیتی می پردازد. در این مطالعه پس از بررسی افزایش بیان miR-184 در سلول های NPSC، میزان افزایش و کاهش ژن های خاصی تحت تأثیر miR-184 مورد آزمایش قرار گرفتند. هم چنین میزان بیان آنتی ژن های ویژه ای در سلول های OPC، به عنوان سلول های پیش ساز الیگودندروسیت ها، نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمایش های انجام شده روی مغز جنین موش، مشابه آزمایشی که در مطالعه Zhao و همکارانش روی مغز جنین جوجه انجام شد (Zhao, He et al. 2010)، به عنوان تأییدی روی آزمایش های پیشین می باشد. چراکه مغز جنین موش در روز 12.5 حاوی سلول های بنیادی پیش ساز عصبی می باشد و با تزریق miR-184 به این سلول ها کاملاً شرایط مشابه شرایط آزمایش روی سلول ها ایجاد می شود و تأثیر روی سلول های NPSCs بررسی می شود. هم چنین با بررسی نتایج RT-PCR نشان داده شد که miR-184 همان تأثیری که در حالت *in vitro* داشته را در حالت *in vivo* از خود نشان می دهد و سبب القای مسیر تمایزی الیگودندروسیتی در NPSC ها می شود. قابل ذکر است که تزریق به مغز موش در ناحیه ویژه ای از مغز که این دسته از سلول ها حضور دارند، یعنی ناحیه *Subventricular zone (SVZ)*، انجام شده است. همین امر نشان دهنده عملکرد اختصاصی و ویژه miR-184 می باشد و اینکه افزایش بیان در مارکرهای سلول های الیگودندروسیتی و کاهش بیان در مارکرهای آستروسیتی و نورونی و نیز القای مسیر تمایزی دلیلی جز تزریق microRNA مورد نظر ما ندارد.

5-1- دستاوردهای طرح

با توجه به نتایج اخذ شده در مراحل انجام آزمایش های مختلف به نظر می رسد RNA غیر کدشونده miR-184 می تواند به عنوان یک گزینه مناسب جهت بهبود روند تمایز به سمت سلول های الیگودندروسیتی استفاده شود.

همانگونه که در نتایج ذکر شد، پس از ترانسداکت سلول های NPSC با miR-184، میزان افزایش بیان ژن های Olig-2, MBP و هم چنین کاهش بیان ژن های Sox-1, LINGO-1, GFAP, NFM با روش QRT-PCR در روزهای 7, 14, 21 مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که ژن های ذکر شده طبق پیش بینی های مورد نظر افزایش و کاهش بیان را از خود نشان می دهند که علت آن تأثیر miR-184 می باشد.

برای تأیید بیش تر در سطح پروتئین در آزمایش بعدی، ICC سلول های ترانسداکت شده NPSC به همراه گروه کنترل روی پلیت های 4 خانه فیکس شدند و افزایش بیان آنتی ژن های Olig-2, NKX2.2، که آنتی ژن های بیانی توسط سلول های پیش ساز الیگودندروسیت ها (OPC) می باشند، در گروه ترانسداکت شده نسبت به گروه کنترل مطابق با فرضیات پروژه نشان داده شد.

در آزمایش وسترن بلائینگ نیز نشان داده شد که ژن های Olig-2, NKX2.2 در گروه ترانسداکت شده نسبت به گروه کنترل افزایش بیان داشته اند. در واقع این آزمایش نیز تأییدی بر آزمایش های قبلی بود.

در این مطالعه نشان داده شد که miR-184 می تواند از طرفی به عنوان مهارکننده مسیرهای تمایزی نورونی و آستروسیتی و نیز از طرف دیگر به عنوان القاگر مسیر تمایزی الیگودندروسیتی باشد. البته این مطالعه اولین مطالعه ای است که در روند تمایزی این miRNA در این زمینه انجام شده است. بنابراین این احتمال وجود دارد که در موجود زنده همین اثر را نشان دهد و این روند تمایزی به سلول های دیگری در بافت مغز سوق یابد که در این صورت عواقبی از جمله از بین بردن تعادل هوموستازی و یا حتی ایجاد سرطان در پیش دارد.

لازم به ذکر است که در اکثر مطالعات انجام شده روی تمایز سلول های بنیادی به سلول های الیگودندروسیتی تنها از فاکتورهای رشد استفاده شده است (Monaco, Maric et al. 2012). در حالی که در این تحقیق، علاوه بر این فاکتورهای رشد، ترانسداکشن با miR-184 نیز مورد استفاده قرار گرفت و از این رو مدت زمان تمایز مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که ترانسداکشن با miR-184 مدت زمان تمایز را از 48 روز به 21 روز کاهش می دهد، در صورتی که غلظت و نوع فاکتورهای رشد هیچ تغییری نداشتند و تنها فاکتور متغیر، حضور miR-184 می باشد.

با توجه به جمیع جهات نتایج این پروژه می توانند به عنوان اولین گام جهت بررسی نقش miR-184 در روند تمایز سلول های NPSC به سلول های الیگودندروسیتی و همچنین نقش احتمالی آن در درمان بیماری MS که یکی از مهمترین علل مرگ و میر در سراسر جهان است، محسوب شود. هم چنین می تواند تأکید بیش تری روی استفاده از RNA های غیرکدشونده که به تازگی در درمان بیماری های خودایمنی مورد توجه قرار گرفته اند و تاکنون مطالعات زیادی روی عملکرد و نقش آنها در بیماری های گوناگون انجام نگرفته است، باشد.

5-2- پیشنهادات برای پژوهش های آینده

استفاده از miRNAها در بیولوژی مولکولی یکی از جدیدترین و پر بحث ترین روش ها می باشد. این RNA های غیر کد کننده به عنوان فاکتورهای تنظیمی بیان ژن محسوب می شوند و در مراحل پس از رونویسی سبب مهار ژن های هدف می شوند. از این ویژگی miRNA ها می توان در بحث های وسیعی استفاده کرد. در مطالعات اخیر نشان داده شد که miRNAها نقش مهمی در درمان بیماری های خودایمنی ایفا می کنند. بنابراین بررسی عملکرد miRNA ها در درمان بیماری ها مؤثر می باشد. از جمله زمینه های دیگر مورد مطالعه، بررسی حضور miRNA ها در بافت های بیماران MS، نقش آن ها در بروز بیماری و مانیتور کردن پیش رفت بیماری و پاسخ بیمار به روش های درمانی مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد. هم چنین می توان از این RNA های غیرکدشونده به عنوان بیومارکر برای شناسایی سریع تر بیماری ها استفاده کرد.

تکرار و تأیید آزمایش های انجام گرفته در این پروژه توسط پژوهشگران دیگر مورد نیاز است تا داده های به دست آمده کاملاً مورد اعتماد باشند. همچنین اثر افزایش بیان miR-184 روی روند تمایزی سلول های NPSC در موجود زنده نیز باید مورد بررسی قرار گیرد. از طرفی باید سایر ژن های مؤثر در مسیر تمایزی الیگودندروسیتی نیز بررسی شوند تا به عنوان تأیید نهایی در تأثیر این miRNA باشد.

هم چنین انجام مطالعات گسترده روی RNA های غیر کدکننده برای پیدا کردن miRNA های مؤثر دیگر در این مسیر تمایزی، از دیگر تحقیقات پیشنهادی این پروژه محسوب می شود. هم چنین انجام پروژه روی موجودات زنده مشابه انسان و وارد شده تحقیقات به فاز کلینیکی این آزمایش، می تواند انجام پروژه های آینده را پیش بینی کند. بررسی هموزیگوت بودن عملکرد miR-184 در مغز موجود زنده و بررسی اینکه در موجود زنده در اثر تزریق سرطان ایجاد نشود از اهداف پژوهش های آینده محسوب می شود. علاوه بر این، پژوهش های آینده در ارتباط با عملکرد miRNA ها در پاسخ های ایمنی، می تواند تأییدی بر نتایج داده های ما در بیماری خودایمنی MS باشد. این تلاش ها می توانند سبب ارائه استراتژی های جدیدی در رابطه با درمان بیماری MS باشند. اگرچه باید مطالعات بیش تری در این زمینه رواج یابد.

- Alevizos, I. and G. G. Illei (2010). "MicroRNAs in Sjogren's syndrome as a prototypic autoimmune disease." *Autoimmun Rev* **9**(9): 618-621.
- Almas, S., J. Vance, T. Baker and T. Hale (2016). "Management of Multiple Sclerosis in the Breastfeeding Mother." *Mult Scler Int* **2016**: 6527458.
- Andrews, J. L. and F. Fernandez-Enright (2015). "A decade from discovery to therapy: Lingo-1, the dark horse in neurological and psychiatric disorders." *Neurosci Biobehav Rev* **56**: 97-114.
- Aparicio, E., P. Mathieu, M. Pereira Luppi, M. F. Almeida Gubiani and A. M. Adamo (2013). "The Notch signaling pathway: its role in focal CNS demyelination and apotransferrin-induced remyelination." *J Neurochem* **127**(6): 819-836.
- Archer, T. C., J. Jin and E. S. Casey (2011). "Interaction of Sox1, Sox2, Sox3 and Oct4 during primary neurogenesis." *Developmental biology* **350**(2): 429-440.
- Asano, H., M. Aonuma, T. Sanosaka, J. Kohyama, M. Namihira and K. Nakashima (2009). "Astrocyte differentiation of neural precursor cells is enhanced by retinoic acid through a change in epigenetic modification." *Stem Cells* **27**(11): 2744-2752.
- Babashah, S. and M. Soleimani (2011). "The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis." *Eur J Cancer* **47**(8): 1127-1137.
- Bahreini, S. A., H. Salmani, M. A. Honardoost, S. Esmaelnejad and H. Zahednasab (2011). "The possible risk of cancer in patients with MS: a controversial issue." *Eur J Neurol* **18**(5): e49; author reply e50.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* **116**(2): 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* **136**(2): 215-233.
- Bassil, R., W. Orent and W. Elyaman (2013). "Notch signaling and T-helper cells in EAE/MS." *Clin Dev Immunol* **2013**: 570731.
- Bhatia, R., P. Bali and R. M. Chaudhari (2015). "Epidemiology and genetic aspects of multiple sclerosis in India." *Ann Indian Acad Neurol* **18**(Suppl 1): S6-S10.
- Birney, E., J. A. Stamatoyannopoulos, A. Dutta, R. Guigo, T. R. Gingeras, E. H. Margulies, Z. Weng, M. Snyder, E. T. Dermitzakis, R. E. Thurman, M. S. Kuehn, C. M. Taylor, S. Neph, C. M. Koch, S. Asthana, A. Malhotra, I. Adzhubei, J. A. Greenbaum, R. M. Andrews, P. Flicek, P. J. Boyle, H. Cao, N. P. Carter, G. K. Clelland, S. Davis, N. Day, P. Dhami, S. C. Dillon, M. O. Dorschner, H. Fiegler, P. G. Giresi, J. Goldy, M. Hawrylycz, A. Haydock, R. Humbert, K. D. James, B. E. Johnson, E. M. Johnson, T. T. Frum, E. R. Rosenzweig, N. Karnani, K. Lee, G. C. Lefebvre, P. A. Navas, F. Neri, S. C. Parker, P. J. Sabo, R. Sandstrom, A. Shafer, D. Vetrie, M. Weaver, S. Wilcox, M. Yu, F. S. Collins, J. Dekker, J. D. Lieb, T. D. Tullius, G. E. Crawford, S. Sunyaev, W. S. Noble, I. Dunham, F. Denoeud, A. Reymond, P. Kapranov, J. Rozowsky, D. Zheng, R. Castelo, A. Frankish, J. Harrow, S. Ghosh, A. Sandelin, I. L. Hofacker, R. Baertsch, D. Keefe, S. Dike, J. Cheng, H. A. Hirsch, E. A. Sekinger, J. Lagarde, J. F. Abril, A. Shahab, C. Flamm, C. Fried, J. Hackermuller, J. Hertel, M. Lindemeyer, K. Missal, A. Tanzer, S. Washietl, J. Korb, O. Emanuelsson, J. S. Pedersen, N. Holroyd, R. Taylor, D. Swarbreck, N. Matthews, M. C. Dickson, D. J. Thomas, M. T. Weirauch, J. Gilbert, J. Drenkow, I. Bell, X. Zhao, K. G. Srinivasan, W. K. Sung, H. S. Ooi, K. P. Chiu, S. Foissac, T. Alioto, M. Brent, L. Pachter, M. L. Tress, A. Valencia, S. W. Choo, C. Y. Choo, C. Ucla, C. Manzano, C. Wyss, E. Cheung, T. G. Clark, J. B. Brown, M. Ganesh, S. Patel, H. Tamma, J. Chrast, C. N. Henrichsen, C. Kai, J. Kawai, U. Nagalakshmi, J. Wu, Z. Lian, J. Lian, P. Newburger, X. Zhang, P. Bickel, J. S. Mattick, P. Carninci, Y. Hayashizaki, S. Weissman, T. Hubbard, R. M. Myers, J. Rogers, P. F. Stadler, T. M. Lowe, C. L. Wei, Y. Ruan, K. Struhl, M. Gerstein, S. E. Antonarakis, Y. Fu, E. D. Green, U. Karaoz, A. Siepel, J. Taylor, L. A. Liefer, K. A. Wetterstrand, P. J. Good, E. A. Feingold, M. S. Guyer, G. M. Cooper, G. Asimenos, C.

N. Dewey, M. Hou, S. Nikolaev, J. I. Montoya-Burgos, A. Loytynoja, S. Whelan, F. Pardi, T. Massingham, H. Huang, N. R. Zhang, I. Holmes, J. C. Mullikin, A. Ureta-Vidal, B. Paten, M. Seringhaus, D. Church, K. Rosenbloom, W. J. Kent, E. A. Stone, S. Batzoglou, N. Goldman, R. C. Hardison, D. Haussler, W. Miller, A. Sidow, N. D. Trinklein, Z. D. Zhang, L. Barrera, R. Stuart, D. C. King, A. Ameer, S. Enroth, M. C. Bieda, J. Kim, A. A. Bhinge, N. Jiang, J. Liu, F. Yao, V. B. Vega, C. W. Lee, P. Ng, A. Yang, Z. Moqtaderi, Z. Zhu, X. Xu, S. Squazzo, M. J. Oberley, D. Inman, M. A. Singer, T. A. Richmond, K. J. Munn, A. Rada-Iglesias, O. Wallerman, J. Komorowski, J. C. Fowler, P. Couttet, A. W. Bruce, O. M. Dovey, P. D. Ellis, C. F. Langford, D. A. Nix, G. Euskirchen, S. Hartman, A. E. Urban, P. Kraus, S. Van Calcar, N. Heintzman, T. H. Kim, K. Wang, C. Qu, G. Hon, R. Luna, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, S. F. Aldred, S. J. Cooper, A. Halees, J. M. Lin, H. P. Shulha, M. Xu, J. N. Haidar, Y. Yu, V. R. Iyer, R. D. Green, C. Wadelius, P. J. Farnham, B. Ren, R. A. Harte, A. S. Hinrichs, H. Trumbower, H. Clawson, J. Hillman-Jackson, A. S. Zweig, K. Smith, A. Thakkapallayil, G. Barber, R. M. Kuhn, D. Karolchik, L. Armengol, C. P. Bird, P. I. de Bakker, A. D. Kern, N. Lopez-Bigas, J. D. Martin, B. E. Stranger, A. Woodroffe, E. Davydov, A. Dimas, E. Eyras, I. B. Hallgrimsdottir, J. Huppert, M. C. Zody, G. R. Abecasis, X. Estivill, G. G. Bouffard, X. Guan, N. F. Hansen, J. R. Idol, V. V. Maduro, B. Maskeri, J. C. McDowell, M. Park, P. J. Thomas, A. C. Young, R. W. Blakesley, D. M. Muzny, E. Sodergren, D. A. Wheeler, K. C. Worley, H. Jiang, G. M. Weinstock, R. A. Gibbs, T. Graves, R. Fulton, E. R. Mardis, R. K. Wilson, M. Clamp, J. Cuff, S. Gnerre, D. B. Jaffe, J. L. Chang, K. Lindblad-Toh, E. S. Lander, M. Koriabine, M. Nefedov, K. Osoegawa, Y. Yoshinaga, B. Zhu and P. J. de Jong (2007). "Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project." *Nature* **447**(7146): 799-816.

Bohnsack, M. T., K. Czaplinski and D. Gorlich (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." *RNA* **10**(2): 185-191.

Borchert, G. M., W. Lanier and B. L. Davidson (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." *Nat Struct Mol Biol* **13**(12): 1097-1101.

Bronevetsky, Y. and K. M. Ansel (2013). "Regulation of miRNA biogenesis and turnover in the immune system." *Immunol Rev* **253**(1): 304-316.

Budde, H., S. Schmitt, D. Fitzner, L. Opitz, G. Salinas-Riester and M. Simons (2010). "Control of oligodendroglial cell number by the miR-17-92 cluster." *Development* **137**(13): 2127-2132.

Bussing, I., F. J. Slack and H. Grosshans (2008). "let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer." *Trends Mol Med* **14**(9): 400-409.

Cahoy, J. D., B. Emery, A. Kaushal, L. C. Foo, J. L. Zamanian, K. S. Christopherson, Y. Xing, J. L. Lubischer, P. A. Krieg, S. A. Krupenko, W. J. Thompson and B. A. Barres (2008). "A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function." *J Neurosci* **28**(1): 264-278.

Castilla-Llorente, V., G. Nicastro and A. Ramos (2013). "Terminal loop-mediated regulation of miRNA biogenesis: selectivity and mechanisms." *Biochem Soc Trans* **41**(4): 861-865.

Cho, W. C. (2010). "MicroRNAs in cancer - from research to therapy." *Biochim Biophys Acta* **1805**(2): 20.217-9.

Cho, W. C. (2010). "MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(8): 1273-1281.

Cohen, J. E., P. R. Lee, S. Chen, W. Li and R. D. Fields (2011). "MicroRNA regulation of homeostatic synaptic plasticity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(28): 11650-11655.

Conrad, T., A. Marsico, M. Gehre and U. A. Orom (2014). "Microprocessor activity controls differential miRNA biogenesis In Vivo." *Cell Rep* **9**(2): 542-554.

Coolen, M. and L. Bally-Cuif (2009). "MicroRNAs in brain development and physiology." *Curr Opin Neurobiol* **19**(5): 461-470.

Cox, M. B., M. J. Cairns, K. S. Gandhi, A. P. Carroll, S. Moscovis, G. J. Stewart, S. Broadley, R. J. Scott, D. R. Booth and J. Lechner-Scott (2010). "MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood." *PLoS One* **5**(8): e12132.

Cummins, J. M., Y. He, R. J. Leary, R. Pagliarini, L. A. Diaz, Jr., T. Sjoblom, O. Barad, Z. Bentwich, A. E. Szafranska, E. Labourier, C. K. Raymond, B. S. Roberts, H. Juhl, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and V. E. Velculescu (2006). "The colorectal microRNAome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3687-3692.

Dai, R. and S. A. Ahmed (2011). "MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases." *Transl Res* **157**(4): 163-179.

Davis, B. N. and A. Hata (2009). "Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms." *Cell Commun Signal* **7**: 18.

De Santis, G., M. Ferracin, A. Biondani, L. Caniatti, M. Rosaria Tola, M. Castellazzi, B. Zagatti, L. Battistini, G. Borsellino, E. Fainardi, R. Gavioli, M. Negrini, R. Furlan and E. Granieri (2010). "Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **226**(1-2): 165-171.

Deng, J. H., P. Deng, S. L. Lin and S. Y. Ying (2015). "Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs." *Methods Mol Biol* **1218**: 321-340.

Denli, A. M., B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting and G. J. Hannon (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* **432**(7014): 231-235.

Dhara, S. K. and S. L. Stice (2008). "Neural differentiation of human embryonic stem cells." *Journal of cellular biochemistry* **105**(3): 633-640.

Du, C., C. Liu, J. Kang, G. Zhao, Z. Ye, S. Huang, Z. Li, Z. Wu and G. Pei (2009). "MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis." *Nat Immunol* **10**(12): 1252-1259.

Dugas, J. C., T. L. Cuellar, A. Scholze, B. Ason, A. Ibrahim, B. Emery, J. L. Zamanian, L. C. Foo, M. T. McManus and B. A. Barres (2010). "Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination." *Neuron* **65**(5): 597-611.

Dugas, J. C. and L. Notterpek (2011). "MicroRNAs in oligodendrocyte and Schwann cell differentiation." *Dev Neurosci* **33**(1): 14-20.

Emery, B., D. Agalliu, J. D. Cahoy, T. A. Watkins, J. C. Dugas, S. B. Mulinyawe, A. Ibrahim, K. L. Ligon, D. H. Rowitch and B. A. Barres (2009). "Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination." *Cell* **138**(1): 172-185.

Engels, B. M. and G. Hutvagner (2006). "Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation." *Oncogene* **25**(46): 6163-6169.

Etemadifar, M. and A. H. Maghzi (2011). "Sharp increase in the incidence and prevalence of multiple sclerosis in Isfahan, Iran." *Mult Scler* **17**(8): 1022-1027.

Fancy, S. P., C. Zhao and R. J. Franklin (2004). "Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS." *Mol Cell Neurosci* **27**(3): 247-254.

Farazi, T. A., J. I. Hoell, P. Morozov and T. Tuschl (2013). "MicroRNAs in human cancer." *Adv Exp Med Biol* **774**: 1-20.

Farazi, T. A., S. A. Juraneck and T. Tuschl (2008). "The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members." *Development* **135**(7): 1201-1214.

Furer, V., J. D. Greenberg, M. Attur, S. B. Abramson and M. H. Pillinger (2010). "The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases." *Clin Immunol* **136**(1): 1-15.

Garo, L. P. and G. Murugaiyan (2016). "Contribution of MicroRNAs to autoimmune diseases." *Cell Mol Life Sci*.

Garzon, R., G. Marcucci and C. M. Croce (2010). "Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges." *Nat Rev Drug Discov* **9**(10): 775-789.

Giovannetti, E., A. Erozenci, J. Smit, R. Danesi and G. J. Peters (2012). "Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs (miRNAs) in anticancer drug resistance and implications for clinical practice." Crit Rev Oncol Hematol **81**(2): 103-122.

Goodin, D. S. (2006). "Magnetic resonance imaging as a surrogate outcome measure of disability in multiple sclerosis: have we been overly harsh in our assessment?" Ann Neurol **59**(4): 597-605.

Gregory, R. I., T. P. Chendrimada, N. Cooch and R. Shiekhattar (2005). "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing." Cell **123**(4): 631-640.

Guo, Z., M. Maki, R. Ding, Y. Yang, B. Zhang and L. Xiong (2011). "Genome-wide survey of tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues." Sci Rep **4**: 5150.

Gupta, S., A. All and C. Kerr (2011). Oligodendrocyte Fate Determination in Human Embryonic Stem Cells, INTECH Open Access Publisher.

Ha, M. and V. N. Kim (2014). "Regulation of microRNA biogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(8): 509-524.

Hadjigargyrou, M., J. Zhi and D. E. Komatsu (2016). "Identification of the microRNA transcriptome during the early phases of mammalian fracture repair." Bone.

Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin and V. N. Kim (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." Genes Dev **18**(24): 3016-3027.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Harfe, B. D. (2005). "MicroRNAs in vertebrate development." Curr Opin Genet Dev **15**(4): 410-415.

Hauser, S. L. and J. R. Oksenberg (2006). "The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration." Neuron **5**: 76-61 : (1)2

He, X., Y. Yu, R. Awatramani and Q. R. Lu (2012). "Unwrapping myelination by microRNAs." Neuroscientist **18**(1): 45-55.

Hecker, M., M. Thamilarasan, D. Koczan, I. Schroder, K. Flechtner, S. Freiesleben, G. Fullen, H. J. Thiesen and U. K. Zettl" (2013) "MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients." Int J Mol Sci **14**(8): 16087-16110.

Hedrich, C. M. and G. C. Tsokos (2011). "Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases." Trends Mol Med **17**(12): 714-724.

Hoffjan, S. and D. A. Akkad (2010). "The genetics of multiple sclerosis: an update 2010." Mol Cell Probes **24**(5): 237-243.

Hoh, A. E. and C. Bisse (2014). "[Oculomotor system and multiple sclerosis]." Ophthalmologie **111**(8): 727-732.

Hu, H. and R. A. Gatti (2011). "MicroRNAs: new players in the DNA damage response." J Mol Cell Biol **3**(3): 151-158.

Jafari, N., H. Shaghghi, D. Mahmoodi, Z. Shirzad, F. Alibeiki, S. Bohlooli and H. P. Dogahneh (2011). "Overexpression of microRNA biogenesis machinery: Drosha, DGCR8 and Dicer in multiple sclerosis patients." J Clin Neurosci **22**(1): 200-203.

Jeker, L. T. and J. A. Bluestone (2010). "Small RNA regulators of T cell-mediated autoimmunity." J Clin Immunol. 357-347 : (3)30

Jernås, M., C. Malmeström, M. Axelsson, I. Nookaew, H. Wadenvik, J. Lycke and B. Olsson (2013). "MicroRNA regulate immune pathways in T-cells in multiple sclerosis (MS)." BMC immunology **14**(1): 1.

Jones, S. A., D. M. Jolson, K. K. Cuta, C. N. Mariash and G. W. Anderson (2003). "Triiodothyronine is a survival factor for developing oligodendrocytes." Mol Cell Endocrinol **199**(1-2): 49-60.

Junker, A., M. Krumbholz, S. Eisele, H. Mohan, F. Augstein, R. Bittner, H. Lassmann, H. Wekerle, R. Hohlfeld and E. Meinl (2009). "MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47." *Brain* **132**(Pt 12): 3342-3352.

Kacperska, M. J., K. Jastrzebski, B. Tomasik, J. Walenczak, M. Konarska-Krol and A. Glabinski (2011). "Selected extracellular microRNA as potential biomarkers of multiple sclerosis activity--preliminary study." *J Mol Neurosci* **56**(1): 154-163.

Kamphuis, W. W., C. Derada Troletti, A. Reijerkerk, I. A. Romero and H. E. de Vries (2015). "The blood-brain barrier in multiple sclerosis: microRNAs as key regulators." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **14**(2): 157-167.

Kanellopoulou, C. and S. Monticelli (2008). "A role for microRNAs in the development of the immune system and in the pathogenesis of cancer." *Semin Cancer Biol* **18**(2): 79-88.

Kanwar, J. R., G. Mahidhara and R. K. Kanwar (2010). "MicroRNA in human cancer and chronic inflammatory diseases." *Front Biosci (Schol Ed)* **2**: 1113-1126.

Kapranov, P., J. Cheng, S. Dike, D. A. Nix, R. Duttagupta, A. T. Willingham, P. F. Stadler, J. Hertel, J. Hackermuller, I. L. Hofacker, I. Bell, E. Cheung, J. Drenkow, E. Dumais, S. Patel, G. Helt, M. Ganesh, S. Ghosh, A. Piccolboni, V. Sementchenko, H. Tammana and T. R. Gingeras (2007). "RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription." *Science* **316**(5830): 1484-1488.

Kapranov, P., A. T. Willingham and T. R. Gingeras (2007). "Genome-wide transcription and the implications for genomic organization." *Nat Rev Genet* **8**(6): 413-423.

Kasper, L. H. and J. Shoemaker (2010). "Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system." *Neurology* **74 Suppl 1**: S2-8.

Keller, A., P. Leidinger, J. Lange, A. Borries, H. Schroers, M. Scheffler, H. P. Lenhof, K. Ruprecht and E. Meese (2009). "Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls." *PLoS One* **4**(10): e7440.

Ketting, R. F., S. E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon and R. H. Plasterk (2001). "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*." *Genes Dev* **15**(20): 2654-2659.

Kim, H., S. Kim, Y. Song, W. Kim, Q.-L. Ying and E.-h. Jho (2015). "Dual function of Wnt signaling during neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells." *Stem cells international* **2015**.

Kingwell, K. (2012). "Disease mechanisms in MS: informing tactics to combat MS." *Nat Rev Neurol* **8**(11): 589.

Kota, J., R. R. Chivukula, K. A. O'Donnell, E. A. Wentzel, C. L. Montgomery, H. W. Hwang, T. C. Chang, P. Vivekanandan, M. Torbenson, K. R. Clark, J. R. Mendell and J. T. Mendell (2009). "Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model." *Cell* **137**(6): 1005-1017.

Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue): D152-157.

Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan and M. Stoffel (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." *Nature* **438**(7068): 685-689.

Kugel, J. F. and J. A. Goodrich (2012). "Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription." *Trends Biochem Sci* **37**(4): 144-151.

Kuypers, N. J., A. N. Bankston, R. M. Howard, J. E. Beare and S. R. Whitemore (2016). "Remyelinating Oligodendrocyte Precursor Cell miRNAs from the Sfbmt2 Cluster Promote Cell Cycle Arrest and Differentiation." *The Journal of Neuroscience* **36**(5): 1698-1710.

Landthaler, M., A. Yalcin and T. Tuschl (2007). "The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis." *Curr Biol* **14**(23): 2162-2167.

Lau, P., J. D. Verrier, J. A. Nielsen, K. R. Johnson, L. Notterpek and L. D. Hudson (2008). "Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes." The Journal of Neuroscience **28**(45): 11720-11730.

Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.

Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23**(20): 4051-4060.

Lee, Y. S., K. Nakahara, J. W. Pham, K. Kim, Z. He, E. J. Sontheimer and R. W. Carthew (2004). "Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways." Cell **117**(1): 69-81.

Lei, W., Y. Luo, K. Yan, S. Zhao, Y. Li, X. Qiu, Y. Zhou, H. Long, M. Zhao, Y. Liang, Y. Su and Q. Lu (2009). "Abnormal DNA methylation in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and dermatomyositis." Scand J Rheumatol **38**(5): 369-374.

Leray, E., T. Moreau, A. Fromont and G. Edan (2016). "Epidemiology of multiple sclerosis." Rev Neurol (Paris) **172**(1): 3-13.

Letzen, B. S., C. Liu, N. V. Thakor, J. D. Gearhart, A. H. All and C. L. Kerr (2010). "MicroRNA expression profiling of oligodendrocyte differentiation from human embryonic stem cells." PloS one **5**(5): e10480.

Li, J. S. and Z. X. Yao (2012). "MicroRNAs: novel regulators of oligodendrocyte differentiation and potential therapeutic targets in demyelination-related diseases." Mol Neurobiol **45**(1): 200-212.

Lin, S.-T., Y. Huang, L. Zhang, M. Y. Heng, L. J. Ptáček and Y.-H. Fu (2013). "MicroRNA-23a promotes myelination in the central nervous system." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(43): 17468-17473.

Lin, S. L. and S. Y. Ying (2013). "Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs." Methods Mol Biol **936**: 209-229.

Lindberg, R. L., F. Hoffmann, M. Mehling, J. Kuhle and L. Kappos (2010). "Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients." Eur J Immunol **40**(3): 888-898.

Liu, R., X. Ma, L. Xu, D. Wang, X. Jiang, W. Zhu, B. Cui, G. Ning, D. Lin and S. Wang (2012). "Differential microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from Graves' disease patients." J Clin Endocrinol Metab **97**(6): E9.972-68

Ludwig, N., P. Leidinger, K. Becker, C. Backes, T. Fehlmann, C. Pallasch, S. Rheinheimer, B. Meder, C. Stahler, E. Meese and A. Keller (2016). "Distribution of miRNA expression across human tissues." Nucleic Acids Res.

Macfarlane, L. A. and P. R. Murphy (2010). "MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer." Curr Genomics **11**(7): 537-561.

Macias, S., R. A. Cordiner, P. Gautier, M. Plass and J. F. Caceres (2015). "DGCR8 Acts as an Adaptor for the Exosome Complex to Degrade Double-Stranded Structured RNAs." Mol Cell **60**(6): 873-885.

Magner, W. J., B. Weinstock-Guttman, M. Rho, D. Hojnacki, R. Ghazi, M. Ramanathan and T. B. Tomasi (2016). "Dicer and microRNA expression in multiple sclerosis and response to interferon therapy." J Neuroimmunol **292**: 78-68

Maki, T., Y. Takahashi, N. Miyamoto, A. C. Liang, M. Ihara, E. H. Lo and K. Arai (2015). "Adrenomedullin promotes differentiation of oligodendrocyte precursor cells into myelin-basic-protein expressing oligodendrocytes under pathological conditions in vitro." Stem cell research **15**(1): 68-74.

Maniataki, E. and Z. Mourelatos (2005). "A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA." Genes Dev **19**(24): 2979-2990.

Mi, S., B. Hu, K. Hahm, Y. Luo, E. S. Kam Hui, Q. Yuan, W. M. Wong, L. Wang, H. Su, T. H. Chu, J. Guo, W. Zhang, K. F. So, B. Pepinsky, Z. Shao, C. Graff, E. Garber, V. Jung, E. X. Wu and W. Wu (2007). "LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis." Nat Med **13**(10): 1228-1233.

Mi, S., R. H. Miller, X. Lee, M. L. Scott, S. Shulag-Morskaya, Z. Shao, J. Chang, G. Thill, M. Levesque, M. Zhang, C. Hession, D. Sah, B. Trapp, Z. He, V. Jung, J. M. McCoy and R. B. Pepinsky (2005). "LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes." Nat Neurosci **8**(6): 745-751.

Miron, V. E., T. Kuhlmann and J. P. Antel (2011). "Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 184-193.

Mix, E., H. Meyer-Rienecker, H. P. Hartung and U. K. Zettl (2010). "Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations." Prog Neurobiol **92**(3): 386-404.

Monaco, M. C. G., D. Maric, A. Bandeian, E. Leibovitch, W. Yang and E. O. Major (2012). "Progenitor-derived oligodendrocyte culture system from human fetal brain." JoVE (Journal of Visualized Experiments)(70): e4274-e4274.

Mourelatos, Z., J. Dostie, S. Paushkin, A. Sharma, B. Charroux, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann and G. Dreyfuss (2002). "miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs." Genes Dev **16**(6): 720-728.

Mycko, M. P., M. Cichalewska, H. Cwiklinska and K. W. Selmaj (2015). "miR-155-3p Drives the Development of Autoimmune Demyelination by Regulation of Heat Shock Protein 40". J Neurosci **35**(50): 16504-16515.

Nave, K. A. (2010). "Oligodendrocytes and the "micro brake" of progenitor cell proliferation." Neuron **65**(5): 577-579.

Nicolay, D. J., J. R. Doucette and A. J. Nazarali (2007). "Transcriptional control of oligodendrogenesis." Glia **55**(13): 1287-1299.

Nugent, M., N. Miller and M. J. Kerin (2011). "MicroRNAs in colorectal cancer: function, dysregulation and potential as novel biomarkers." Eur J Surg Oncol **37**(8): 649-654.

Ohtsuka, M., H. Ling, Y. Doki, M. Mori and G. A. Calin" (2015) MicroRNA Processing and Human Cancer." J Clin Med **4**(8): 1651-1667.

Otaegui, D., S. E. Baranzini, R. Armananzas, B. Calvo, M. Munoz-Culla, P. Khankhanian, I. Inza, J. A. Lozano, T. Castillo-Trivino, A. Asensio, J. Olaskoaga and A. Lopez de Munain (2009) "Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients." PLoS One **4**(7): e6309.

Pauley, K. M., S. Cha and E. K. Chan (2009). "MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases." J Autoimmun **32**(3-4): 189-194.

Pedraza, C. E., C. Taylor, A. Pereira, M. Seng, C.-S. Tham, M. Izrael and M. Webb (2014). "Induction of oligodendrocyte differentiation and in vitro myelination by inhibition of rho-associated kinase." ASN neuro **6**(4): 1759091414538134.

Pfeiffer, S. E., A. E. Warrington and R. Bansal (1993). "The oligodendrocyte and its many cellular processes." Trends Cell Biol **3**(6): 191-197.

Pugliatti, M., S. Sotgiu and G. Rosati (2002). "The worldwide prevalence of multiple sclerosis." Clin Neurol Neurosurg **104**(3): 182-191.

Qu, X., J. Zhou, T. Wang, J. Han, L. Ma, H. Yu, D. Geng, H. Fan, Q. Zhang, F. Hua and R. Yao (2016). "MiR-30a inhibits Th17 differentiation and demyelination of EAE mice by targeting the IL-21R." Brain Behav Immun.

Reubinoff, B. E., P. Itsykson, T. Turetsky, M. F. Pera, E. Reinhartz, A. Itzik and T. Ben-Hur (2001). "Neural progenitors from human embryonic stem cells." Nature biotechnology **19**(12): 1134-1140.

Rudick, R. A., J. C. Lee, J. Simon and E. Fisher (2006). "Significance of T2 lesions in multiple sclerosis: A 13-year longitudinal study." Ann Neurol **60**(2): 236-242.

Saadatnia, M., M. Etemadifar and A. H. Maghzi (2007). "Multiple sclerosis in Isfahan, Iran." Int Rev Neurobiol **79**: 357-375.

Saini, H. K., S. Griffiths-Jones and A. J. Enright (2007). "Genomic analysis of human microRNA transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(45): 17719-17724.

Schratt, G. M., F. Tuebing, E. A. Nigh, C. G. Kane, M. E. Sabatini, M. Kiebler and M. E. Greenberg (2006). "A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development." Nature **439**(7074): 283-289.

Shaltouki, A., J. Peng, Q. Liu, M. S. Rao and X. Zeng (2013). "Efficient generation of astrocytes from human pluripotent stem cells in defined conditions." Stem Cells **31**(5): 941-952.

Shin, D., J. Y. Shin, M. T. McManus, L. J. Ptacek and Y. H. Fu (2009). "Dicer ablation in oligodendrocytes provokes neuronal impairment in mice." Ann Neurol **66**(6): 843-857.

Siegel, S. R., J. Mackenzie, G. Chaplin, N. G. Jablonski and L. Griffiths (2012). "Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis." Mol Biol Rep **39**(5): 6219-6225.

Sim, F. J., C. Zhao, J. Penderis and R. J. Franklin (2002). "The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation." J Neurosci **22**(7): 2451-2459.

Slavin, A., L. Kelly-Modis, M. Labadia, K. Ryan and M. L. Brown (2010). "Pathogenic mechanisms and experimental models of multiple sclerosis." Autoimmunity **43**(7): 504-513.

Sonkoly, E., M. Stahle and A. Pivarcsi (2008). "MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation." Semin Cancer Biol **18**(2): 131-140.

Sonntag, K. C. (2010). "MicroRNAs and deregulated gene expression networks in neurodegeneration." Brain Res **1338**: 48-57.

Stappert, L., L. Borghese, B. Roese-Koerner, S. Weinhold, P. Koch, S. Terstegge, M. Uhrberg, P. Wernet and O. Brüstle (2013). "MicroRNA-based promotion of human neuronal differentiation and subtype specification." PLoS one **8**(3): e59011.

Steinman, L. and S. S. Zamvil (2006). "How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis." Ann Neurol **60**(1): 12-21.

Stidworthy, M. F., S. Genoud, W. W. Li, D. P. Leone, N. Mantei, U. Suter and R. J. Franklin (2004). "Notch1 and Jagged1 are expressed after CNS demyelination, but are not a major rate-determining factor during remyelination." Brain **127**(Pt 9): 1928-1941.

Suyama, K., M. Watanabe, D. Sakai, T. Osada, M. Imai and J. Mochida (2007). "Nkx2. 2 expression in differentiation of oligodendrocyte precursor cells and inhibitory factors for differentiation of oligodendrocytes after traumatic spinal cord injury." Journal of neurotrauma **24**(6): 1013-1025.

Svaren, J. (2014). "MicroRNA and transcriptional crosstalk in myelinating glia." Neurochem Int **77**: 50-57.

Thamilarasan, M., D. Koczan, M. Hecker, B. Paap and U. K. Zettl (2012). "MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." Autoimmun Rev **11**(3): 174-179.

Tosic, M., S. Torch, V. Comte, M. Dolivo, P. Honegger and J. M. Matthieu (1992). "Triiodothyronine has diverse and multiple stimulating effects on expression of the major myelin protein genes." J Neurochem **59**(5): 1770-1777.

Voorhoeve, P. M. and R. Agami (2007). "Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly." Biochim Biophys Acta **1775**(2): 274-282.

Wang, J., J. Chen and S. Sen (2016). "MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics." J Cell Physiol **231**(1): 25-30.

Watanabe, M., T. Hadzic and A. Nishiyama (2004). "Transient upregulation of Nkx2.2 expression in oligodendrocyte lineage cells during remyelination." Glia **46**(3): 311-322.

Weiner, H. L. (2009). "The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease?" Ann Neurol **65**(3): 239-248.

Wiemer, E. A. (2007). "The role of microRNAs in cancer: no small matter." Eur J Cancer **43**(10): 1529-1544.

Wienholds, E. and R. H. Plasterk (2005). "MicroRNA function in animal development." FEBS Lett **579**(26): 5911-5922.

Winter, J., S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory and S. Diederichs (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." Nat Cell Biol **11**(3): 228-234.

Yi, T., H. Arthanari, B. Akabayov, H. Song, E. Papadopoulos, H. H. Qi, M. Jedrychowski, T. Guttler, C. Guo, R. E. Luna, S. P. Gygi, S. A. Huang and G. Wagner (2015). "eIF1A augments Ago2-mediated Dicer-independent miRNA biogenesis and RNA interference." Nat Commun **6**: 7194.

Zeng, Y., R. Yi and B. R. Cullen (2005). "Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha." EMBO J **24**(1): 138-148.

Zhang, Y., Y. P. Zhang, B. Pepinsky, G. Huang, L. B. Shields, C. B. Shields and S. Mi (2015). "Inhibition of LINGO-1 promotes functional recovery after experimental spinal cord demyelination." Exp Neurol **266**: 68-73.

Zhao, X., X. He, X. Han, Y. Yu, F. Ye, Y. Chen, T. Hoang, X. Xu, Q.-S. Mi and M. Xin (2010). "MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation." Neuron **65**(5): 612-626.

Zhao, X., X. He, X. Han, Y. Yu, F. Ye, Y. Chen, T. Hoang, X. Xu, Q. S. Mi, M. Xin, F. Wang, B. Appel and Q. R. Lu (2010). "MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation." Neuron **65**(5): 612-626.

Zhu, Q., X. Zhao, K. Zheng, H. Li, H. Huang, Z. Zhang, T. Mastracci, M. Wegner, Y. Chen and L. Sussel (2014). "Genetic evidence that Nkx2. 2 and Pdgfra are major determinants of the timing of oligodendrocyte differentiation in the developing CNS." Development **141**(3): 548-555.

Abstract:

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory disease of the central nervous system (CNS). It causes damage to oligodendrocytes and axons in the CNS. Definite causes of MS have not been recognized yet. As oligodendrocyte precursor cells (OPCs) can be detected in MS lesions, it is plausible that the endogenous repair mechanisms that normally respond to myelin damage become defective throughout the course of disease. One suggested way of compensating this deficiency is to use iPSC-derived OPCs, which were shown to successfully remyelinate. Because of the low efficiency and long differentiation interval of using OPCs to generate oligodendrocytes, scientists became interested in molecular driving factors such as microRNAs, which are small noncoding RNAs that play important regulatory roles in various cellular processes by cleavage or translational inhibition of their target mRNAs. In this study, we recruited the lentiviral based overexpression of miR-184 to enhance the differentiating process of human neural progenitor stem cells (hNPSCs) to oligodendrocytes. QRT-PCR results showed the down regulation of target genes including Bcl2L1, LINGO1 and Sox1 and also up regulation of oligodendrocyte specific genes such as Olig2 and MBP. Western blotting and immunocytochemistry experiments results are also in accordance with qRT-PCR results. In conclusion, we could confirm the enhancer role of miR-184 in inducing the differentiation of hNPSCs to oligodendrocytes, both from efficiency and temporal point of view. Currently, in vivo studies are under operation which hopefully confirm our in vitro studies.

Key words: MS, microRNA, Human Neural Progenitor Stem Cells, Oligodendrocytes, Central Nervous System, Differentiation, Transduction, Lentivirus packaging